



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/53 (2017.08); G01N 27/4145 (2017.08); G01N 27/4146 (2017.08); B82Y 15/00 (2017.08)

(21)(22) Заявка: 2017105284, 17.02.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2017Дата регистрации:
29.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.02.2017

(45) Опубликовано: 29.03.2018 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Преснова Галина Васильевна (RU),
Преснов Денис Евгеньевич (RU),
Рубцова Майя Юрьевна (RU),
Крупенин Владимир Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: S.-W. RYU, C.-H. KIM et al. Gold
nanoparticle embedded silicon nanowire
biosensor for applications of label-free DNA
detection, Biosensors and Bioelectronics, 2010,
vol.25, N 9, pp.2182-2185. EA 20321 B1,
30.10.2014. WO 2001013432 A1, 22.02.2001. US
20100270174 A1, 28.10.2010. US 20050164432
A1, 28.07.2005. US 8835984 B2, 16.09.2014.

(54) ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

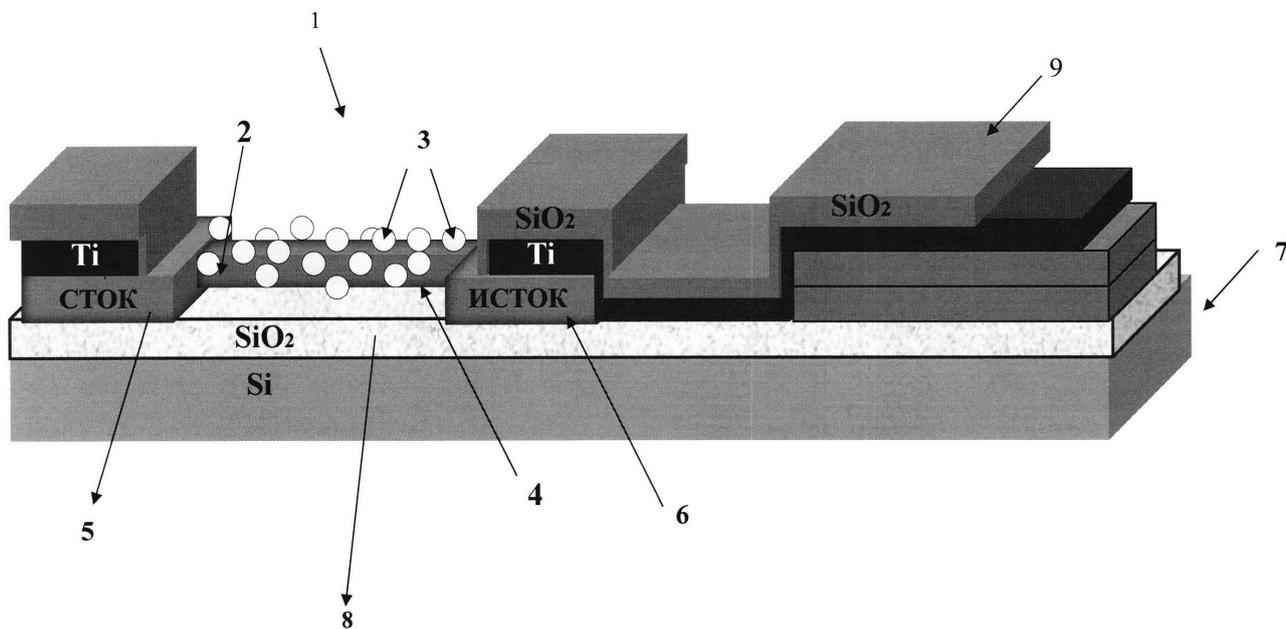
(57) Реферат:

Полезная модель относится к одной из областей медицины и биологии, в частности к медицинской измерительной технике и к микро- и нанoeлектронике, применяемой в диагностике при определении биологически активных соединений. Полезная модель может быть использована как составная часть функциональных диагностических элементов на основе нанoeлектронных устройств для качественного и количественного определения белков, гормонов, онкомаркеров, в том числе простат-специфического антигена (ПСА) в жидких биологических средах для целей клинической лабораторной диагностики. Полевой транзистор для определения биологически активных соединений включает кремниевую

подложку, проводящие электроды, представляющие собой исток и сток транзистора, чувствительный элемент, размещенный между двумя проводящими электродами с образованием канала транзистора, диэлектрические покрытия, обеспечивающие изоляцию проводящих электродов, при этом чувствительный элемент представляет собой нанопровод, выполненный в тонкопленочной структуре кремний-на-изоляторе, образованной на кремниевой подложке, при этом на поверхность нанопровода нанесены золотые наночастицы диаметром 2-6 нм с плотностью нанесения 100-7000 шт./мкм², на которые ковалентно иммобилизованы фрагменты высокоспецифических антител к

определяемому биологически активному соединению. Техническим результатом заявляемой полезной модели является повышение чувствительности нанопровода полевого транзистора для определения биологически активных соединений, при этом также

обеспечивается ориентированная иммобилизация антител, сокращается расстояние от их активных центров до поверхности золотой наночастицы, отсутствуют дополнительные стадии модификации антител.



Фиг. 7

RU 178317 U1

RU 178317 U1

Область техники

Полезная модель относится к одной из областей медицины и биологии, в частности к медицинской измерительной технике и к микро- и наноэлектронике, применяемой в диагностике при определении биологически активных соединений. Полезная модель может быть использована как составная часть функциональных диагностических элементов на основе наноэлектронных устройств для качественного и количественного определения белков, гормонов, онкомаркеров, в том числе простат-специфического антигена (ПСА) в жидких биологических средах для целей клинической лабораторной диагностики.

Уровень техники

В патенте РФ №2517114 (МПК G01N 33/48, G01Q 60/24, опубликовано 27.05.2014) описан способ определения простат-специфического антигена в жидкой среде. Для этого используется плоский гибкий кантилевер, одна из плоскостей которого покрыта бычьим сывороточным альбумином, а другая содержит два слоя, один из которых ковалентно связан с поверхностью кантилевера, а другой содержит химически связанные с предыдущим слоем молекулы антитела, специфически распознающего простат-специфический антиген. Сигнал регистрируют оптическим методом путем измерения изменения изгиба кантилевера, который взаимодействует с жидкой средой. Этот метод обладает большой трудоемкостью и более низкой чувствительностью, кроме того для измерения одного образца требуется значительно больше времени, чем в методе, который использует предлагаемый сенсор.

В патенте РФ №2539677 (МПК G01Q 70/00, H01L 29/772, B82Y 40/00, опубликовано 20.01.2015) и в работе [D.E. Presnov, S.V. Amitonov, P.A. Krutitskii, V.V. Kolybasova, I.A. Devyatov, V.A. Krupenin, I.I. Soloviev. A highly ph-sensitive nanowire field-effect transistor based on silicon on insulator. // Beilstein journal of nanotechnology, 4, pp. 330-335 (2013)] описан датчик на основе полевого транзистора с наноразмерным каналом, который может быть использован при определении физико-химических и электрических параметров наноразмерных объектов физической, химической и биологической природы (принято в качестве прототипа). Чувствительный элемент такого датчика сформирован в верхнем слое пластины кремния на изоляторе и представляет собой тонкую кремниевую проволоку, соединенную с внешними металлическими электродами, через которую пропускается электрический ток. Чувствительность такого устройства к рН определяются его геометрической формой и ограничена максимальным значением 59 мВ/рН.

В статье [A. Kim, C.S. Ah, C.W. Park, J.-H. Yang, T. Kim, C.-G. Ahn, S.H. Park, G.Y. Sung, Direct label-free electrical immunodetection in human serum using a flow-through-apparatus approach with integrated field-effect transistor, Biosensors and Bioelectronics 25 (2010) 1767-1773] предложен способ определения ПСА и других маркеров с использованием полевого транзистора. Сначала определялась проводимость транзистора с иммобилизованными антителами в буфере. Далее в ячейку вводили сыворотку крови человека, содержащую исследуемый антиген, и, соответственно, происходило связывание антител на поверхности с антигеном из раствора. Затем систему отмывали и в буфере опять измерялась проводимость транзистора. Разница между двумя полученными сигналами и принималась за аналитический отклик на исследуемую концентрацию антигена. При этом иммобилизация антител происходила с использованием аминопропилтриметоксисилана (АПТЕС) и глутарового альдегида. ПСА измеряли в концентрации от 1нг/мл и выше. Недостатком способа является длительное время анализа и недостаточная чувствительность.

В статье [N. Gao, W. Zhou, X. Jiang, G. Hong, T.-M. Fu, and C.M. Lieber, General strategy for biodetection in high ionic strength solutions using transistor-based nanoelectronic sensors. Nano Lett. 2015 Mar 11;15(3):2143-8] авторы предлагают совместную модификацию нанопроводов АПТЭС и полиэтиленгликолем (ПЭГ), который образует пористый биопроницаемый слой на поверхности нанопровода.

Значительная разница между транзисторами, модифицированными АПТЭС и АПТЭС/ПЭГ, показывает, что полимер играет важную роль в модуляции локального ионного окружения канала-нанопровода в полевом транзисторе и таким образом преодолевается проблема дебаевского экранирования для биодатчиков на основе таких устройств под соответствующие физиологические условия. Измерения ПСА проводили в широком диапазоне концентраций (10-1000 нМ). В данной работе продемонстрирован общий подход, который позволяет уменьшать величину дебаевского экранирования. Однако, как отмечают сами авторы, необходимо проведение дальнейших исследований для успешной модификации поверхности нанопровода слоем полимера, в который включены антитела в конфигурации, доступной для связывания с определенными белковыми соединениями. Кроме того, актуален вопрос об отмывке пористой поверхности от прореагировавшего вещества для повторного использования датчика. Технология изготовления полевых транзисторов с каналом-нанопроводом, описанная в данном примере, трудно масштабируема и обладает невысокой воспроизводимостью за счет использования синтезированных нанопроводов с существенным разбросом параметров.

Из литературы известны способы повышения чувствительности полупроводниковых датчиков на основе кремниевых нанопроводов путем использования нескольких управляющих электродов. В статье [J.-H. Ahn, S.-J. Choi, J.-W. Han, T.J. Park, S.Y. Lee and Y.-K. Choi, Double-Gate Nanowire Field Effect Transistor for a Biosensor, Nano Lett. 2010, 10, 2934-2938] приведен пример структуры, в которой два управляющих электрода находились по обе стороны от кремниевого нанопровода. Путем изменения управляющего потенциала на одном из электродов достигалось увеличение сигнала, регистрируемое с помощью второго электрода, в зависимости от воздействия окружающей среды. В работе [M.-J. Spijkman, J.J. Brondijk, T.C.T. Geuns, E.C.P. Smits, T. Cramer, F. Zerbetto, P. Stoliar, F. Biscarini, P.W.M. Blom, and D.M. de Leeuw, Dual-Gate Organic Field-Effect Transistors as Potentiometric Sensors in Aqueous Solution, Adv. Funct. Mater. 2010, 20, 898-905] описан механизм повышения рН-чувствительности полупроводникового канала-нанопровода транзистора в зависимости от используемого управляющего электрода. В этой системе один электрод был погружен в исследуемую жидкостную среду, а второй располагался непосредственно под чувствительным элементом системы в твердотельной структуре транзистора. В случае регистрации изменения сигнала в зависимости от величины рН жидкости с помощью нижнего электрода, чувствительность системы, определяемая в единицах мВ/рН, возрастала по сравнению со случаем регистрации изменения сигнала с помощью электрода, погруженного в жидкость. Отношение определяемых чувствительностей к рН различных электродов равнялось отношению емкостей этих электродов к нанопроводу. При этом собственная чувствительность нанопровода (изменение его проводимости в зависимости от величины заряда на его поверхности) не зависела от того, какой из управляющих электродов использовался.

В статье [S.-W. Ryu, C.-H. Kim, J.-W. Han, C.-J. Kim, C.Jung, H.G. Park, Y.-K. Choi, Gold nanoparticle embedded silicon nanowire biosensor for applications of label-free DNA detection. Biosensors and Bioelectronics 25 (2010) 2182-2185.] описан нанопровод для детектирования ДНК рака молочной железы. Особенность нанопровода заключается в том, что на его

поверхности с толщиной оксидной пленки 5 нм наносилась тонкая пленка золота при 500°C в таком режиме, чтобы происходило образование золотых наночастиц с размером от 0,07 до 15 нм. Затем на поверхности золотой пленки иммобилизовали олигонуклеотиды, модифицированные тиоловой группой и комплементарные целевой ДНК. При этом чувствительность нанопровода падала при увеличении плотности наночастиц на поверхности. Недостатком предложенного метода является слишком большой разброс размера золотых наночастиц наряду с их высокой поверхностной плотностью, а также необходимость использования сложного оборудования. Кроме того, возникает необходимость модификации реагентов тиоловыми группами.

Технической проблемой является повышение чувствительности нанопровода (чувствительного элемента полевого транзистора) для определения биологически активных соединений.

Раскрытие сущности полезной модели

Техническим результатом заявляемой полезной модели является повышение чувствительности нанопровода полевого транзистора для определения биологически активных соединений, при этом также обеспечивается ориентированная иммобилизация антител, сокращается расстояние от их активных центров до поверхности золотой наночастицы, отсутствуют дополнительные стадии модификации антител.

Указанный технический результат достигается за счет полевого транзистора для определения биологически активных соединений, включающего кремниевую подложку, проводящие электроды, представляющие собой исток и сток транзистора, чувствительный элемент, размещенный между двумя проводящими электродами с образованием канала транзистора, диэлектрические покрытия, обеспечивающие изоляцию проводящих электродов, при этом чувствительный элемент представляет собой нанопровод, выполненный в тонкопленочной структуре кремний-на-изоляторе, образованной на кремниевой подложке, при этом на поверхность нанопровода нанесены золотые наночастицы диаметром 2-6 нм с плотностью нанесения 100-7000 шт/мкм², на которые ковалентно иммобилизованы фрагменты высокоспецифических антител к определяемому биологически активному соединению.

Проводящие электроды могут быть выполнены из хрома, золота, платины, алюминия, титана или сильнолегированного кремния.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1. показано изображение в сканирующем электронном микроскопе готовой структуры полевого транзистора с нанопроводом, с контактными площадками, покрытыми изолирующим диэлектриком;

на Фиг. 2. показано схематическое изображение методов модификации кремниевых нанопроводов: 1) на поверхность кремния, обработанного АПТМС/ФДИТЦ, иммобилизованы специфические антитела к ПСА (классический способ); 2) нанопровод модифицирован МПТМС/наночастицами золота, на которые ковалентно иммобилизованы фрагменты антител того же клона;

на Фиг. 3. показано изображение в сканирующем электронном микроскопе нанопровода с золотыми наночастицами на его поверхности, на которые ковалентно иммобилизованы фрагменты антител того же клона;

на Фиг. 4. показана зависимость транспортногo тока через транзистор от напряжения на затворе и рН окружающей жидкости: 1) поверхность транзистора модифицирована классическим способом; 2) поверхность транзистора модифицирована наночастицами золота. На наночастицы золота были ковалентно иммобилизованы антитела или фрагменты антител одного клона;

на Фиг. 5. показан график изменения транспортного тока транзистора при внесении раствора ПСА в концентрации 80 пг/мл в $0.01 \times \Phi\text{СБ}$; нанопровод 10 модифицирован АПТМС/ФДИТЦ, нанопровод 2 модифицирован МПТМС/наночастицами золота. На наночастицы золота были ковалентно иммобилизованы антитела или фрагменты антител одного клона;

на Фиг. 6. показана калибровочная кривая для определения ПСА в $0.01 \times \Phi\text{БР рН } 8.0$;

на Фиг. 7. показано схематическое изображение полевого транзистора с каналом-нанопроводом для определения биологически активных соединений с нанесенными на нанопровод наночастицами золота и ковалентно иммобилизованными фрагментами антител;

на Фиг. 8. - схематическое изображение молекулы IgG.

Осуществление полезной модели

Полевой транзистор 1 для определения биологически активных соединений включает: нанопровод 2, проводящие электроды 5, 6, кремниевую подложку 7, слои диэлектриков 8, 9, предназначенные для изоляции сверху и снизу электродов 5,6.

Наноразмерный чувствительный элемент (нанопровод) 2 образует канал 4 транзистора и размещен между двумя проводящими электродами 5 и 6, выполняющими функции стока и истока транзистора. Два проводящих электрода 5 и 6 изолированы снизу от кремниевой подложки 7 сплошным слоем диэлектрического покрытия 8 (слой SiO_2), а сверху они по всей поверхности покрыты слоем диэлектрического покрытия 9 (слой SiO_2) для изоляции от жидкостной биологической среды. Электроды 5 и 6 могут быть выполнены из любого, хорошо проводящего (сопротивление которого значительно меньше сопротивления нанопровода) материала, который обеспечивает контакт, обладающий малым сопротивлением, к чувствительному элементу 2. Примерами таких материалов являются: хром, золото, платина, алюминий, титан и другие хорошо проводящие металлы; также возможно использовать сильнолегированный кремний). На фиг. 7 изображены электроды 5, 6, которые выполнены из титана Ti.

Кремниевая подложка 7 выполняет функцию управляющего электрода транзистора (затвора).

Чувствительный элемент (нанопровод) 2 выполнен в тонкопленочной структуре кремний-на-изоляторе, образованной на подложке 7, при этом слой кремния на чувствительном элементе обладает полупроводниковыми свойствами.

Данный полевой транзистор был изготовлен по стандартной технологии следующим образом.

Структуры нанопровода 2, электроды 5 и 6 (сток исток) были изготовлены в верхнем слое пластины 9 кремния на изоляторе (КНИ). Для этого проводилась электронная литография, с помощью которой формировался первоначальный рисунок структуры транзистора в тонком слое электронного резиста, нанесенного на поверхность кремния. Засвеченные участки удалялись в специальном проявителе, и на них наносился тонкий (15 нм) слой алюминия, который служил маской для травления верхнего слоя кремния в последующем процессе. Формирование структуры нанопровода 2 происходило в результате переноса рисунка алюминиевой маски в верхний слой кремния пластины КНИ (кремний на изоляторе) в процессе анизотропного реактивно-ионного травления во фторсодержащей смеси газов. Для дополнительной изоляции электродов 5, 6 от подложки 7, которая выступает в роли управляющего затвора к нанопроводу 2, происходило утолщение диэлектрического слоя 8 под ними. Это осуществлялось двумя

последовательными напылениями слоев SiO_2 толщиной по 200 нм на всю поверхность чипа (образца) за исключением центральной области с структурами нанопровода 2. В качестве материала для электродов и контакта к кремниевой структуре наносился слой титана толщиной 30 нм. Процесс изготовления завершался покрытием металлических контактных площадок (электродов) диэлектриком 9 для их изоляции от жидкостной среды (фиг. 1). Готовые чипы (образцы со структурами) помещались в керамический держатель. Контактные площадки образца соединялись с контактами держателя с помощью ультразвуковой пайки.

Далее проводили модификацию поверхности кремния 0,2 М раствором меркаптопропилтриметоксисилана (МПТМС) в сухом толуоле в течение 12 часов при 80°C , рабочей поверхности нанопровода 2, предварительно обработанного кислородной плазмой для образования на поверхности нанопровода 2 оксидного слоя. С поверхностью нанопроводов 2, не содержащих оксидного слоя, МПТМС не связывается. Для удаления несвязавшегося МПТМС нанопровод 2 промывали раствором толуола, метанола и дистиллированной воды.

Образование оксидного слоя возможно провести другими способами, например, раствор «пираньи» (смесь концентрированной серной кислоты и пероксида водорода 1:1) с последующей отмывкой водой. Использование кислородной плазмы более технологично и воспроизводимо: в таком случае на поверхности образуется ровный оксидный слой одинаковой толщины, в то время как при обработке «пираньей» поверхность толщина оксидного слоя не всегда одинакова. К тому же такая операция (обработка пираньей) требует многократных промывок. Помимо пираньи есть аналогичные химические растворы, которые возможно применить, например, вместо (или вместе) с серной кислотой к пероксиду водорода добавляют соляную кислоту.

Модификация поверхности кремния раствором МПТМС позволяет образовать на поверхности кремния тиоловые группы. Т.к. золото крайне инертный материал, и оно мало с чем реагирует, то тиоловые соединения являются одними из немногих веществ, с которыми золото образует прочную связь.

Затем на рабочую поверхность нанопровода 2 наносили растворы золотых наночастиц 3, содержащих 5 мМ раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), и выдерживали в течение двух часов. Таким образом, формировали монослой из отдельных золотых наночастиц 3, ковалентно связанных с поверхностью нанопровода 2. Размер наночастиц 3, нанесенных на нанопровод составлял 2-6 нм. Плотность и равномерность покрытия золотыми наночастицами 3 контролировали с использованием сканирующего электронного микроскопа. Для иммобилизации (нанесения) золотых наночастиц 3 могут быть использованы любые бифункциональные реагенты, которые позволяют провести ковалентное связывание золотых наночастиц 3 с поверхностью кремния или оксида кремния. Допустимый диапазон плотности золотых наночастиц 3, равномерно модифицированных на поверхности нанопровода 2, лежит в диапазоне 100-7000 шт./ $\mu\text{м}^2$ для наночастиц диаметром 2-6 нм. Конкретное значение зависит от поставленной задачи, размера белков и т.д.

Затем на поверхность частиц 3 иммобилизовали фрагменты антител (любых антител класса IgG) с использованием собственных тиоловых групп, образующихся в процессе расщепления молекулы антитела на два одинаковых фрагмента, содержащих одну тяжелую и одну легкую цепь, за счет разрыва -S-S-связей между ними. Для этого антитела диализовали в течение 12 ч против 0,01 M Na - фосфатного буфера (0,15 M NaCl, 5 mM ЭДТА, pH 6,0). После этого добавляли 12 мг 2-меркаптоэтиламина (МЭА) и инкубировали в течение 1,5 часов при 37°C . Разделяли на колонке Sephadex-G25 или

диализовали в буфере с ЭДТА. Процесс получения фрагментов антител контролировали с использованием методов SDS- электрофореза, который проводили по стандартной методике, описанной Laemmli [U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (5259) (1970) 680-685], в 9% геле. В
5 данном случае использовали буфер для нанесения образца, не содержащий меркаптоэтанол.

Для иммобилизации фрагментов моноклональных антител, специфичных к ПСА, на модифицированную поверхность нанопровода 2, покрытого золотыми наночастицами, наносили по 1 мкл растворов фрагментов антител с концентрацией 100 мкг/мл в 0,1 М
10 К-фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,15 М NaCl (ФСБ -фосфатно солевой буферный раствор) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этого поверхность сенсора отмывали три раза по 5 мин в буферном растворе ФСБ, содержащем 0,1% Tween 20 (ФСБТ) от не вступивших в реакцию антител. После иммобилизации проводили
15 блокирование свободных центров связывания белков на поверхности нанопроводов для уменьшения неспецифических реакций с помощью 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина в ФСБ (1 ч, 37°C).

Схематическое изображение молекулы IgG показано на Фиг. 8. При использовании меркаптоэтиламина происходит разрыв дисульфидных связей между тяжелыми цепями и получаются две одинаковые симметричные половинки антител Ab-фрагмент.

20 Молекулярная масса целого антитела порядка 150 кДа.

При образовании комплексов антиген-антитело происходит изменение поверхностного заряда нанопровода, увеличение количества образовавшихся комплексов на поверхности нанопровода способствует усилению его отклика.

В результате получают полевой транзистор с каналом, представляющим собой
25 нанопровод, покрытый золотыми наночастицами, на которых ковалентно иммобилизованы фрагменты высокоспецифических антител к определяемому соединению.

Полевой транзистор работает следующим образом. Полученный полевой транзистор 1 с каналом-нанопроводом 2, покрытым золотыми наночастицами 3 с фрагментами
30 высокоспецифических антител и изолированными электродами 5, 6, помещают в керамический держатель, электроды 5,6 транзистора с помощью ультразвуковой пайки соединяют с электродами держателя тонкой (20-50 мкм) алюминиевой или золотой проволокой. Места соединений и подводящие провода изолируют герметиком. Датчик помещают в электронно-измерительную ячейку. На открытую поверхность транзистора
35 1 наносится капля исследуемого раствора, в которую сверху погружается электрод сравнения. При проведении измерений в жидкой среде (аналитическом растворе), для управления током транзистора помимо основного затвора - подложки 7 пластины КНИ, использовался дополнительный затвор - опущенный в жидкую среду электрод сравнения, который представлял собой серебряную проволоку, покрытую слоем хлорида
40 серебра. Измерения проводятся при комнатной температуре в нормальных условиях. На транзисторе 1 фиксируется напряжение между стоком и истоком, на подложке-затворе, электроде сравнения и измеряется изменение тока через нанопровод 2 на внешнее воздействие (жидкие среды). Измерения проводились при положительных напряжениях (от 0 до 7 В) на основном затворе, что соответствовало инверсному
45 (электронному) каналу 4 проводимости транзистора 1.

В предлагаемом техническом решении в качестве жидкой среды могут быть использованы как модельные водные растворы, например, содержащие ПСА, так и биологические жидкости - сыворотка крови человека, моча и т.д.

Для предварительной оценки заявляемого транзистора измерялись его вольтамперные и затворные характеристики, а также изучалось поведение транзисторов при изменении рН: на поверхность транзистора помещалась капля жидкости объемом 100-200 мкл с различными значениями рН (в диапазоне от 5 до 8), и регистрировались изменения тока через нанопровод 2, вызванные изменением его поверхностного заряда, при изменении рН.

Измерения ПСА проводились в микрожидкостной системе в статическом режиме без протока жидкости, который обеспечивал стабильные и воспроизводимые сигналы отклика транзисторов. Как и при измерении рН на поверхность транзистора помещалась капля жидкости объемом 100-200 мкл с раствором буфера или нулевой сыворотки и проводилось непрерывное измерение транспортного тока транзистора. Затем раствор удаляли и на нанопровод 2 помещали каплю жидкости объемом 100-200 мкл определенной концентрации ПСА. Фиксировали изменение установившегося значения транспортного тока транзистора. После проведения измерений капля удалялась микропипеткой с поверхности транзистора и проводилось трехкратная промывка нейтральным раствором. Затем процедура повторялась с использованием капли раствора другой концентрации.

Преимущества использования вышеописанного транзистора иллюстрируют следующие примеры. Нижеприведенные примеры с ПСА были проведены на транзисторе с нанопроводом, на котором размер золотых наночастиц составлял 5 нм, а плотность их распределения на нанопроводе $\sim 5000 \pm 500$ шт./ $\mu\text{м}^2$.

Пример (сравнительный) 1.

Опыт проводили с использованием двух исходных транзисторов с каналом-нанопроводом, изготовленных в соответствии с приведенным выше способом. Поверхность нанопровода первого транзистора модифицировали классическим способом с использованием аминопропилтриметоксисилана (АПТМС) и кросслинкера орто-фенилендиизотиоционата (ФДИТЦ) см. Фиг. 2 (1). Для этого рабочая поверхность нанопроводов, очищенная кислородной плазмой, выдерживалась в 10%-й растворе АПТМС в этаноле, отфильтрованном через фильтр (0,2 мкм). После инкубации в течение 12 ч образцы промывали три раза этанолом, затем дистиллированной водой. Далее высушенные образцы выдерживали в сушильном шкафу при 100°C в течение 10 мин. Затем на них наносили раствор 6 мг ФДИТЦ в ДМФА (диметилформамид), содержащий 10%-й пиридин, и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученные образцы отмывали три раза в метиловом спирте и затем в деионизованной воде. Затем на поверхность иммобилизовали целые молекулы антител к ПСА или их фрагменты: на модифицированную поверхность нанопроводов наносили по 1 мкл растворов антител (или их фрагментов) с концентрацией 100 мкг/мл в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,15 М NaCl и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этого пластины отмывали три раза по 5 мин в буферном растворе ФСБ, содержащем 0,1% Tween20 (ФСБТ). После иммобилизации проводили блокирование свободных центров связывания белков на поверхности нанопровода для уменьшения неспецифических реакций с помощью 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина в ФСБ (1 ч, 37°C).

Поверхность второго транзистора, предварительно обработанного кислородной плазмой, модифицировали 0,2 М раствором меркаптопропилтриметоксисилана (МПТМС) в сухом толуоле в течение 12 часов при 80°C. Затем нанопровод промывался раствором толуола, метанола и дистиллированной воды для удаления несвязавшегося МПТМС. Затем на рабочую поверхность нанопровода наносили раствор золотых

наночастиц, содержащих 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и выдерживали в течение двух часов и отмывали несвязавшиеся наночастицы водой при сильном перемешивании.

5 Затем на золотые наночастицы ковалентно иммобилизовали фрагменты антител к ПСА того же клона, полученными как указано выше см. Фиг. 2 (2) и Фиг. 3. и блокировали свободные центры связывания белков на поверхности нанопроводов для уменьшения неспецифических реакций 1%-ым раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина в ФСБ (1 ч, 37°C).

10 Для обоих нанопроводов были проведены измерения зависимости величины транспортного тока от времени в 0.1 мМ фосфатном буфере, содержащим 1,5 мМ NaCl, (0,01x ФСБ) с двумя различными значениями pH (pH=7,0 и pH=5,0). Измерения проводились при фиксированном напряжении сток - исток и постоянном значении напряжения на обоих затворах (подложке и электроде сравнения). Затем напряжение на электроде сравнения изменялось таким образом, чтобы изменить величину тока 15 через транзистор при pH=5,0 до исходного уровня, зарегистрированного при pH=7,0 (Фиг. 4(1)).

Так, уровень тока через транзистор, модифицированный классическим способом с использованием АПТМС и кросслинкера орто-фенилендиизотиоционата (ФДИТЦ) в буфере с pH=7,0 при напряжении на электроде сравнения 350 мВ совпал с уровнем тока 20 для буфера с pH=5,0 при напряжении на электроде сравнения 225 мВ. Таким образом, изменение напряжения на электроде сравнения при изменении значения pH с 7,0 до 5,0 составило величину 125 мВ. Для транзистора, поверхность которого была модифицирована наночастицами золота, это значение равнялось 140 мВ (Фиг. 4(2)). Как видно из фиг. 4, для нанопровода, модифицированного наночастицами золота и 25 фрагментами антител, разница напряжений (140 мВ) на электроде сравнения (Ue) при одном и том же изменении pH (5,0 - 7,0) имеет большее значение, чем для нанопровода, модифицированного классическим способом с использованием АПТМС/ФДИТЦ и целыми молекулами антител (125 мВ), таким образом транзистор с каналом нанопроводом, модифицированным наночастицами золота обладает лучшей 30 чувствительностью к pH, равной 70 ± 3 мВ / pH.

Таким образом, чувствительность по pH составляла величину 70 ± 3 мВ / pH и 62 ± 3 мВ / pH для первого и второго нанопровода, соответственно. Такая чрезвычайно высокая чувствительность, наблюдаемая на заявляемом транзисторе с каналом нанопроводом, покрытым золотыми наночастицами, может быть объяснена 35 значительным увеличением величины отношения площади поверхности к объему нанопровода, что приводит к увеличению локальной концентрации водородных ионов вблизи модифицированной поверхности нанопровода.

Пример (сравнительный) 2.

Опыт проводили с использованием двух нанопроводов. Поверхность первого 40 нанопровода модифицирована классическим способом с использованием АПТМС и ФДИТЦ. Поверхность второго модифицировали МПТМС/наночастицами золота с иммобилизованными фрагментами антител к ПСА того же клона, полученными как указано выше. После этого провода отмывали три раза по 5 мин в буферном растворе ФСБТ, содержащем 0,1% Tween 20. После иммобилизации проводили блокирование 45 свободных центров связывания белков на поверхности пластин для уменьшения неспецифических реакций с помощью 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина в ФСБ (1 ч, 37°C). Затем раствор удаляли, несколько раз промывали 0,01xФСБ, и на нанопровод помещали каплю жидкости объемом 100-200 мкл с

одинаковой концентрацией ПСА 80 пг/мл в 0,01×ФСБ. Фиксировали изменение установившегося значения транспортного тока транзистора. Полученная разница значений тока представлена на Фиг. 5.

Пример 3.

5 Специфичность определения ПСА была продемонстрирована следующим образом: при добавлении в систему раствора белков, неспецифичного к антителам к ПСА, например, бычьего сывороточного альбумина в высокой концентрации (1 мкг/мл буфера 0,01×ФСБ) изменения транспортного тока через нанопровод не наблюдалось.

Пример 4.

10 Опыт проводили с использованием транзистора с каналом-нанопроводом, на поверхности которого были иммобилизованы золотые наночастицы и фрагменты антител к ПСА. Для количественного определения ПСА осуществляли предварительную градуировку системы. Для этого проводили эксперименты с серией растворов, содержащих различную известную концентрацию ПСА в 0,01×ФСБ с солью, и
15 определяли изменение тока через нанопровод для всех исследуемых образцов с различными концентрациями ПСА. На основе полученных результатов строили градуировочную кривую зависимости величины изменения тока от концентрации ПСА - Фиг. 6. Из приведенной фигуры видно, что транзистор с каналом-нанопроводом, модифицированным золотыми наночастицами позволяет измерять ПСА в широком
20 линейном диапазоне. Предел обнаружения ПСА был рассчитан как среднее значение электропроводности для раствора, не содержащего Пса (0 нг/мл ПСА) плюс 3 стандартных отклонения и составил 23 фг/мл. Таким образом, присоединение золотых наночастиц с иммобилизованными фрагментами антител к ПСА к поверхности нанопровода привело к существенному увеличению чувствительности датчика на основе
25 транзистора с каналом-нанопроводом.

Таким образом, из приведенных примеров видно, что предложенный полевой транзистор с каналом-нанопроводом для определения биологически активных соединений действительно позволяет проводить качественный и количественный анализ жидких сред на содержание биологически активных соединений и позволяет повысить
30 чувствительность определения биологически активных соединений на примере ПСА. Достижение аналогичного результата справедливо и для других биологически активных соединений, таких как белки, гормоны и др. При этом также обеспечивается ориентированная иммобилизация антител, сокращается расстояние от их активных центров до поверхности золотой наночастицы, отсутствуют дополнительные стадии
35 модификации антител.

Подобный полевой транзистор может быть легко интегрирован в электронно-измерительную ячейку, что позволяет быстро и воспроизводимо фиксировать изменения заряда вблизи поверхности нанопровода.

40 (57) Формула полезной модели

1. Полевой транзистор для определения биологически активных соединений, включающий кремниевую подложку, проводящие электроды, представляющие собой исток и сток транзистора, чувствительный элемент, размещенный между двумя проводящими электродами с образованием канала транзистора, диэлектрические
45 покрытия, обеспечивающие изоляцию проводящих электродов, отличающийся тем, что

- чувствительный элемент представляет собой нанопровод, выполненный в тонкопленочной структуре кремний-на-изоляторе, образованной на кремниевой

подложке, при этом на поверхность нанопровода нанесены золотые наночастицы диаметром 2-6 нм с плотностью нанесения 100-7000 шт./мкм², на которые ковалентно иммобилизованы фрагменты высокоспецифических антител к определяемому биологически активному соединению.

5 2. Транзистор по п. 1, отличающийся тем, что проводящие электроды выполнены из хрома, золота, платины, алюминия, титана или сильнолегированного кремния.

10

15

20

25

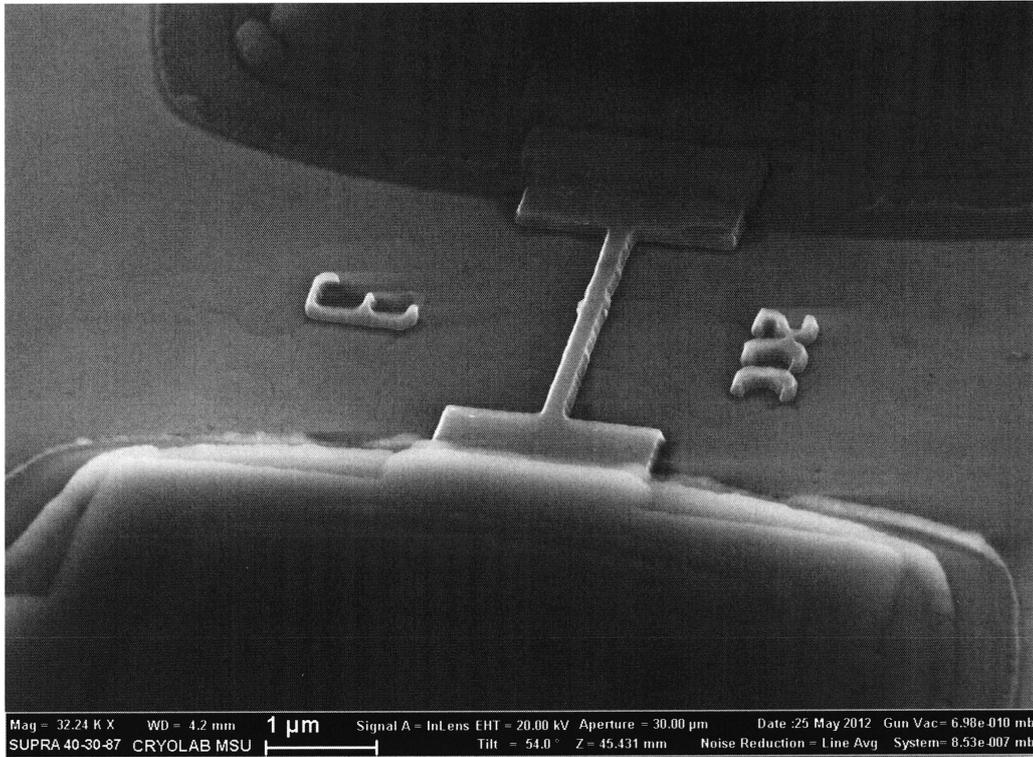
30

35

40

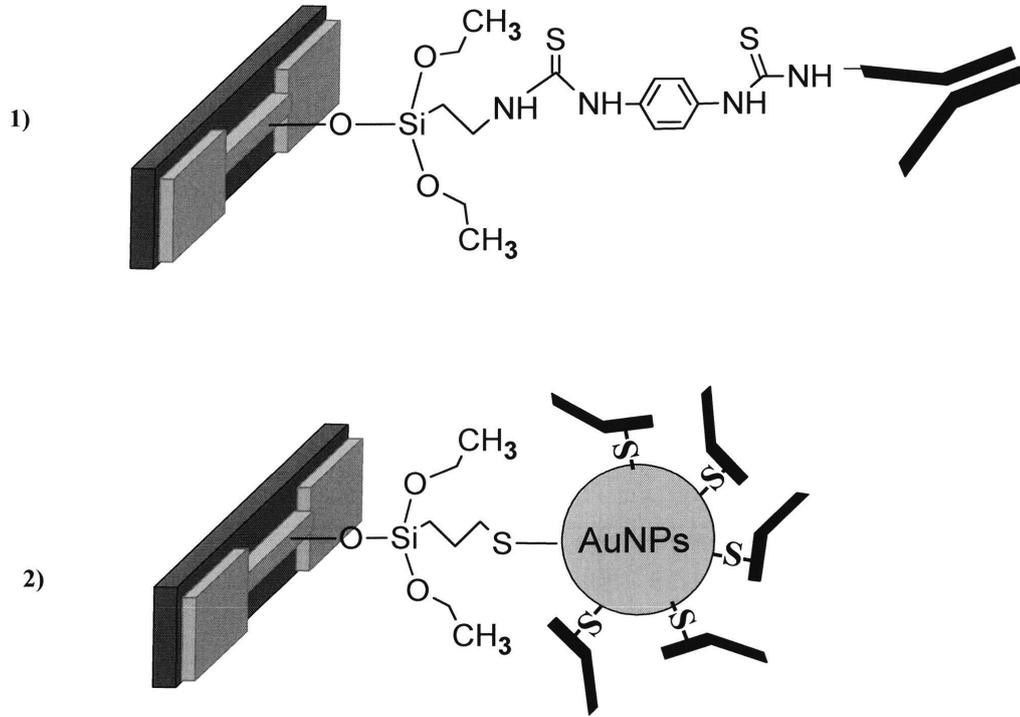
45

ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ



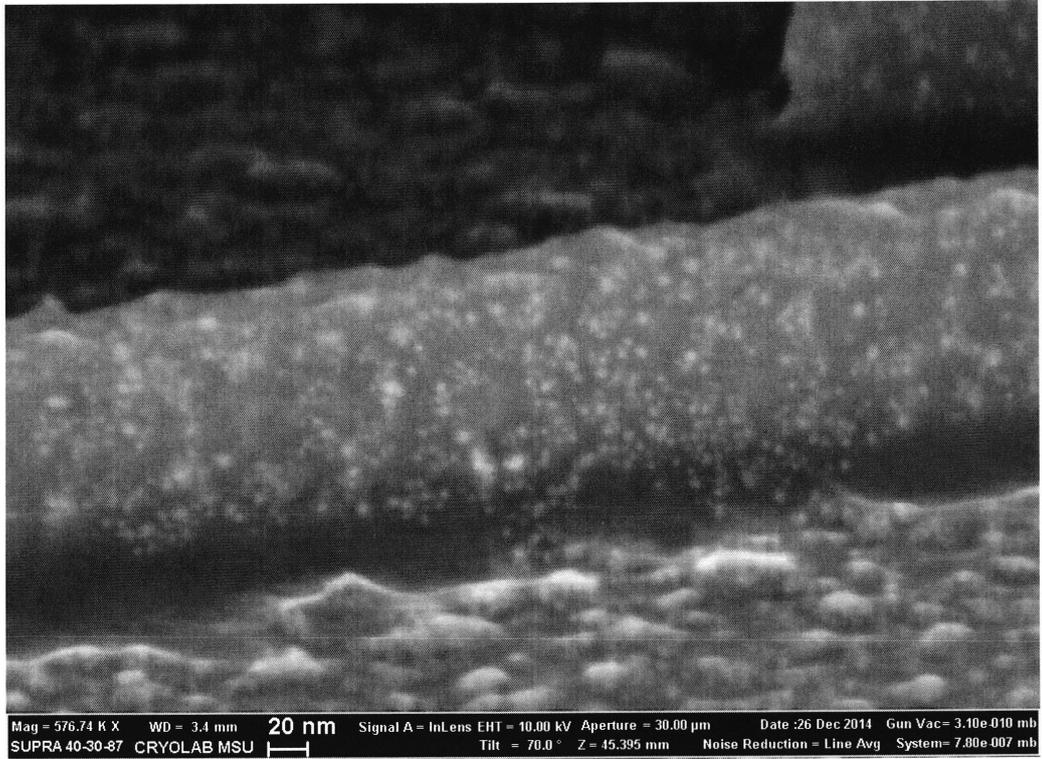
Фиг. 1.

ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ



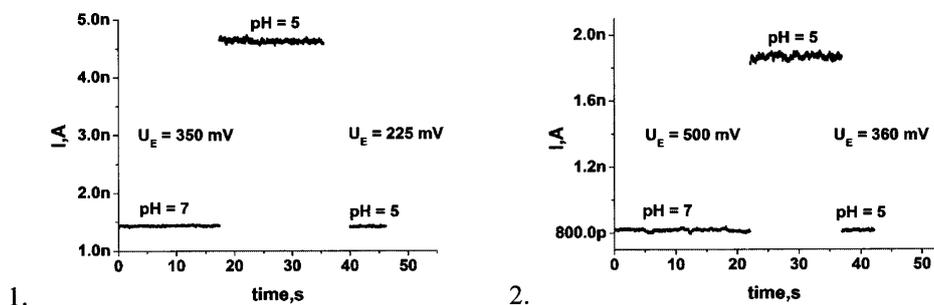
Фиг. 2.

**ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

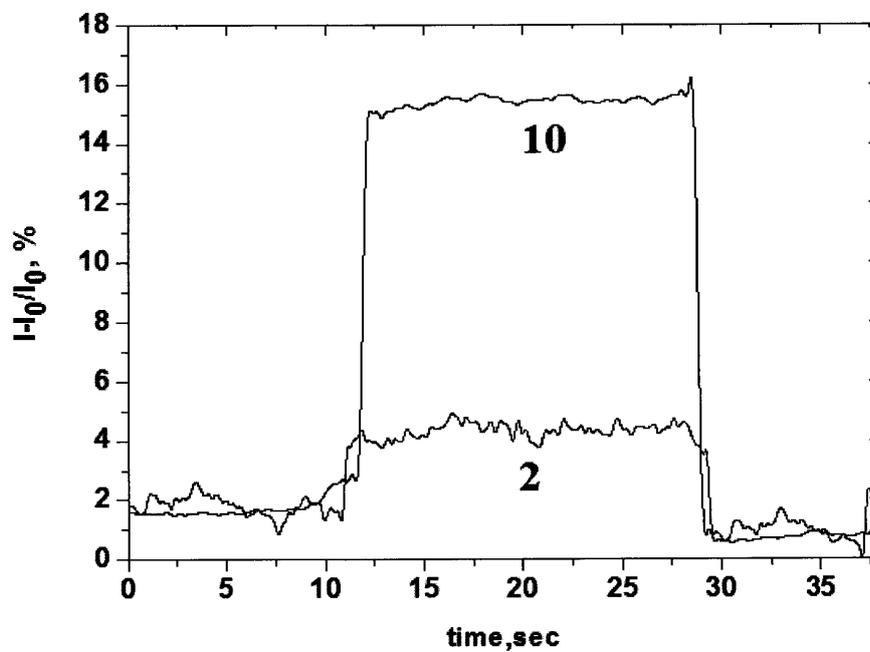


Фиг. 3.

ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

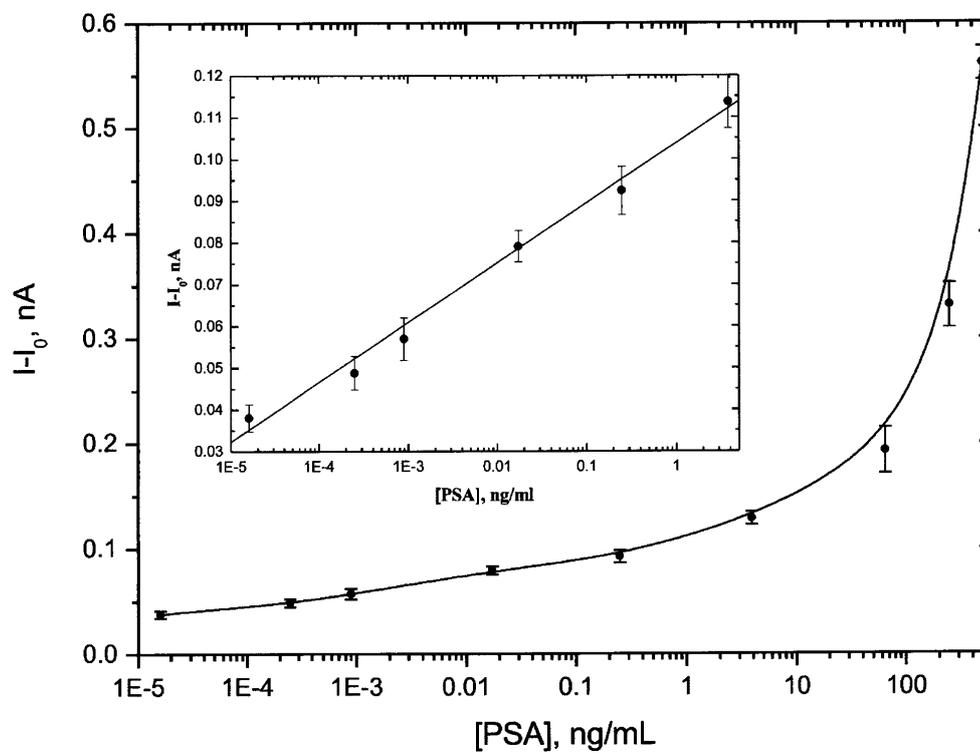


Фиг. 4.



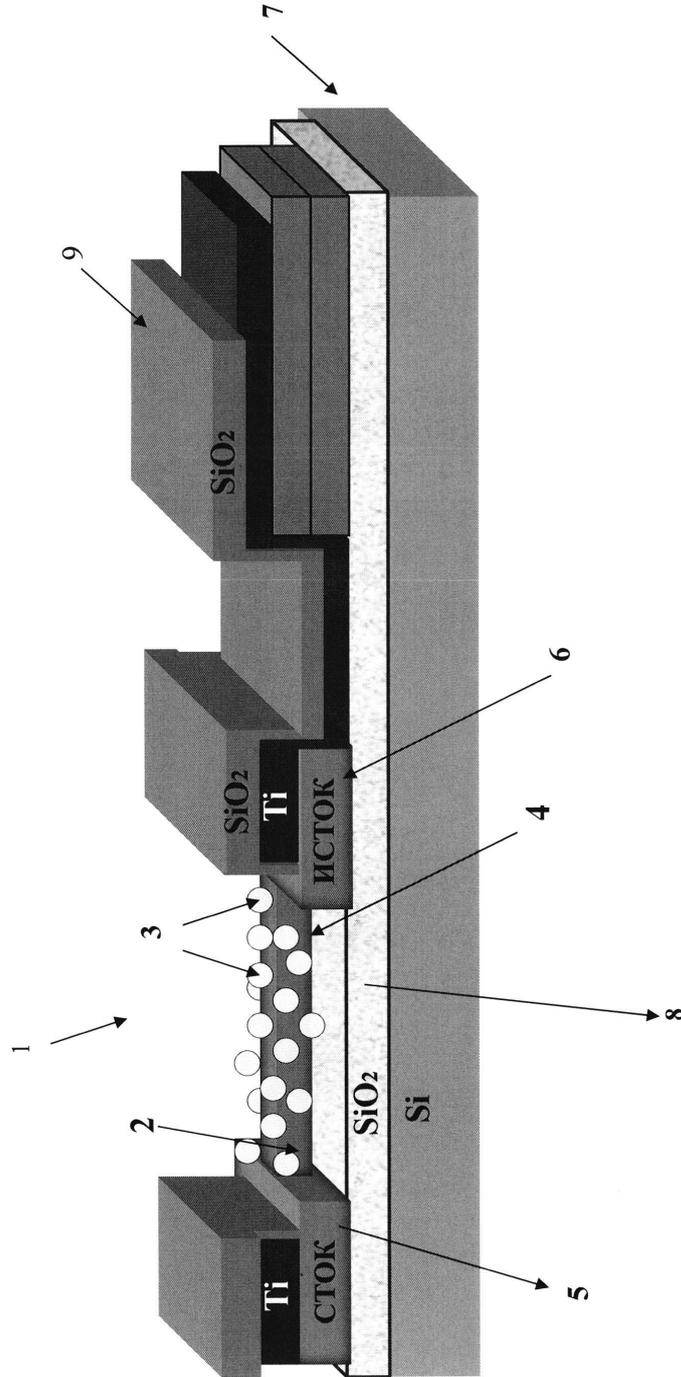
Фиг. 5.

ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ



Фиг. 6.

ПОЛЕВОЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ



Фиг. 7.

