

НАНОСТРУКТУРОВАНІЙ КРЕМНІЙ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ТРАНСДЮСЕР ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІМУНОБІОСЕНСОРІВ

*М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук
Н. Ф. Слишик, аспірантка**

*К. Є. Шаванова, кандидат біологічних наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України*

*М. М. Мельниченко, доктор біологічних наук
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка*

*А. В. Жердєв, Б. Б. Дзантієв, доктори біологічних наук
Інститут біохімії імені А. В. Баха РАН, Москва*

Наведено експериментальні дані щодо ефективності використання структурованого нанопористого кремнію (сНПК) як трансдюсера в імунобіосенсорах, призначених для контролю ретровірусного лейкозу великої рогатої худоби (RBL) і визначення вмісту таких мікотоксинів як Т2 і патулін в об'єктах навколишнього середовища.

Наноструктурований кремній, імунобіосенсиори, Т2 мікотоксин, патулін, лейкоз, діагностика.

Раніше [1] нами було розроблено кілька типів оптичних імунобіосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу та еліпсометрії повного внутрішнього віддзеркалення. Для виконання всіх практичних вимог щодо високої чутливості аналізу, а також простоти, дешевизни і швидкості його проведення ми пропонуємо використовувати структурований нанопористий кремній (сНПК) як трансдюсер для імунобіосенсорів з реєстрацією специфічного сигналу на основі зміни хемілюмінесценції (ХЛ) або фотоструму цієї структури.

Як модель низькомолекулярних токсинів ми використовували Т-2 мікотоксин і патулін. Крім того, розглянуто ефективність використання запропонованого імунобіосенсора для біохімічної діагностики ЛВРХ.

Мікотоксини, зокрема Т2, афлатоксини, зеареленон, патулін, викликають великий інтерес, адже вони широко поширені і характеризуються високим рівнем токсичності. Мікотоксини, що є продуктом життєдіяльності мікроскопічних грибів, останнім часом привертають все більше уваги. Ці речовини високотоксичні для живих організмів (ембріотоксичні, мутагенні та канцерогенні ефекти), а нещодавно виникла небезпека їх використання в цілях біотероризму (наприклад, застосування такого їх представника, як Т2, у порівнянні з іпритом або люїзитом, має на декілька порядків більше летальних випадків) [2].

Вірусний лейкоз, як і мікотоксини, поширений скрізь і на всіх континентах. Необхідно підкреслити, що таке захворювання може передаватися через їжу від заражених тварин до людини. Показники якості і безпеки продуктів харчування

*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

© М. Ф. Стародуб, Н. Ф. Слишик, К. Є. Шаванова,
М. М. Мельниченко, А. В. Жердєв, Б. Б. Дзантієв, 2014

стають пріоритетом на тлі стану навколишнього середовища з одного боку і в результаті зниження санітарних умов з іншого.

Традиційна методологія аналізу мікотоксинів та інших низькомолекулярних токсинів, а також біохімічна діагностика ряду захворювань, включаючи ретровірусний ЛВРХ, базуються зазвичай на використанні такого інструментального аналізу, як високоефективна рідинна чи газова хроматографії з мас-спектроскопією, або рідинна хроматографія з мас-спектроскопією, або ELISA-метод. У зв'язку з надзвичайно високою складністю та вартістю аналізу, виконаного за допомогою цих методів, розвиток інноваційних підходів, таких як імунні аналізи і розробка специфічних хемо- та біосенсорів, є дуже актуальною [3].

Мета досліджень – отримання даних щодо деяких фізико-хімічних властивостей сНПК, розробка алгоритму аналізу, результати використання біосенсора і вірогідний механізм формування специфічного сигналу.

Матеріали та методика досліджень. Ми використовували леговані бором монокристалічні кремнієві квадратні пластини з питомим опором $1 \text{ Ом} \times \text{см}$, площею 100 см^2 і товщиною $0,3 \text{ мкм}$. Поверхню пластин не полірували. Шари сНПК були отримані шляхом травлення в розчині $\text{HF}:\text{HNO}_3$ при кімнатній температурі, природному сонячному освітленні і тривалістю від 1 до 20 хв. Товщина сНПК шару варіювала від 3 до 60 нм, контролювалася параметрами технологічного процесу хімічної модифікації поверхні монокристалічного кремнію і визначалася за допомогою Оже (Auger) електронної спектроскопії в LAS-2000. Структуру поверхні сНПК вивчали за допомогою скануючого тунельного мікроскопа (СТМ) і скануючого електронного мікроскопа. Аналіз отриманих зображень показує, що поверхня сНПК регулярно вкрита порами висотою до 20 нм (рис. 1).

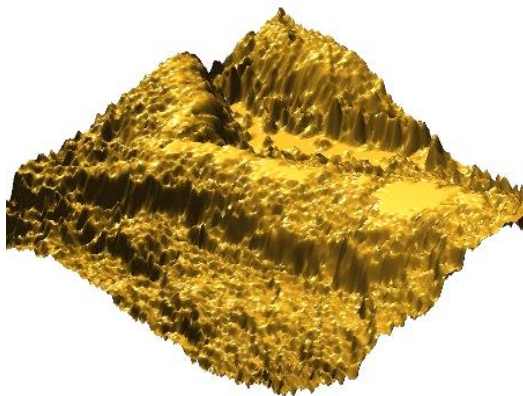


Рис. 1. СТМ-зображення поверхні сНПК. Відсканована область $1 \times 1 \text{ мкм}$ (товщина шару 20 нм)

Характеристики товщини пор сНПК і концентрації O, C і SiO_x залежно від часу травлення наведено на рис. 2.

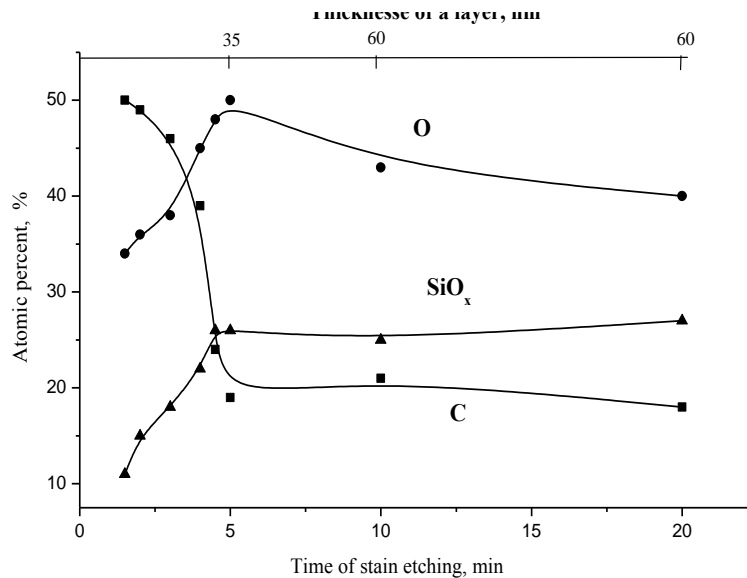


Рис. 2. Залежність концентрації O, C і SiO_x від часу травлення плям

Схема оптичного пристрою на основі сНПК для реєстрації сигналу фотоопору при формуванні специфічного імунного комплексу наведена на рис. 3.

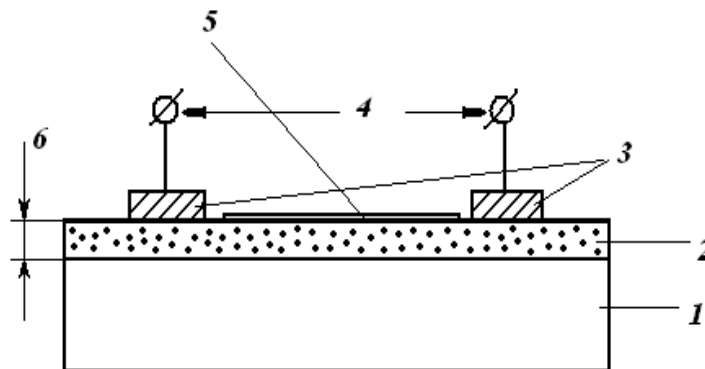


Рис. 3. Схема структури фоторезистора на основі сНПК, призначеного для аналізу взаємодій між біологічними структурами:

1 – кристалічний кремній, 2 – сНПК, 3 – електричні контакти (Al товщиною ~3 мкм), 4 – джерела прикладеної напруги, 5 – біологічний об'єкт, 6 – товщина сНПК 10-40 нм.

На початку вимірювання специфічне антитіло Ab в об'ємі 1 мкл було розташовано на поверхні фоторезистора між контактами. Надалі цей розчин випарювали при кімнатній температурі або в повітряному потоці.

Застосовується постійна напруга (5 В) від стабілізованого джерела живлення до омичних контактів. Силу току вимірювали за допомогою цифрового вольтметра В7-35 без освітлення (у темновому режимі). Так само і фотострум (різниця між струмом при освітленні та темноті) був зареєстрований в зменшенні чутливості поверхні у білому спектрі світла (джерело А, освітлення 7000 лк). При нанесенні шару антигену Ag на сенсорну пластину і після його висихання вимірювання світлового і темного потоку були повторені. Ці ж вимірювання були проведені і після утворення імунних комплексів (взаємодія антигену Ag із специфічним антитілом Ab у сироватці крові). Контроль досягнення датчиком вихідного стану було проведено відповідно до зменшення

значення темногоструму після промивки сенсорної поверхні буферним розчином. Тривалість одного аналізу становить лише 5 – 10 хв.

Дизайн прототипу для реєстрації специфічного імунного комплексу за фотолюмінесценцією (ФЛ) від сНПК включає джерело ультрафіолетового (УФ) випромінювання з довжиною хвилі 350 нм, два фотодіоди (2 і 3) на основі монокристалічного кремнію, розміщені під кутом 20 – 25° до пластини з шару сНПК і фотодіод, призначений для визначення УФ світла(рис. 4).

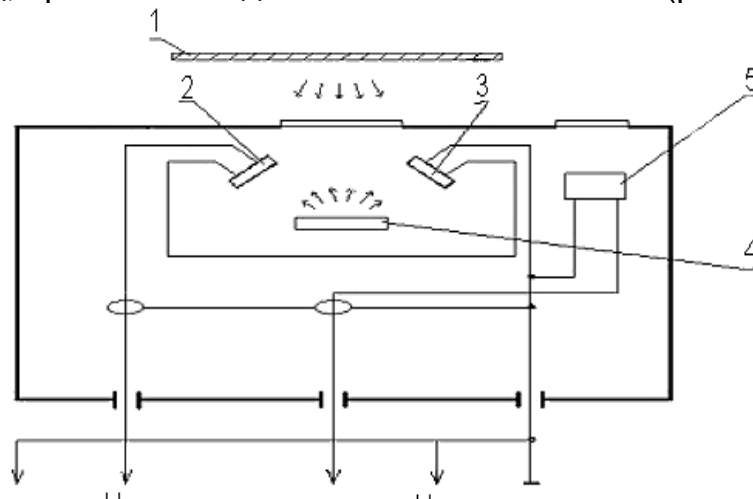


Рис. 4. ФЛ біосенсор:

1 – джерело УФ випромінювання з довжиною хвилі 350 нм; 2 і 3 – дві основи з монокристалічного кремнію; 4 – фотодіод; 5 – фотодіод для визначення інтенсивності УФ світла

У процесі адсорбції біологічних молекул рівень ФЛ з сНПК і вихід напруги на послідовно з'єднаних фотодатчиках зменшуються. Застосування двох фотодатчиків ФЛ підвищує чутливість приладу. Для контролю можливих флуктуацій і в разі зміни рівня УФ використовується додатковий фотодіод. Фотодіоди зі структурою n-p-p+ працюють у режимі фотогенерування. Така конструкція належить до систем диференціального типу.

Фотоелектричні процеси в шарах сНПК, які належать до напівпровідників, реалізуються у результаті фотогенерування пар електрон–отвір та їх наступного розділення і рекомбінації. У процесі адсорбції на поверхні сНПК можуть виникати нові фотоелектричні ефекти. Нанокристаліти з кремнію розмірами від одного до десятків нм є кремнієвими ділянками, що не розчиняються, і центрами протікання електрохімічних та хімічних реакцій. При розмірах менше 15 – 20 нм вони оточені кванто-розмірними ефектами, які призводять до квантування енергетичних спектрів носіїв заряду, розширення зони заборони до 1,7 – 3,4 еВ і зниження діелектричної проникності. Люкс-амперні характеристики отриманих зразків описуються двома графіками: лінійним і сублінійним, який досягає насичення при освітленості більше 10000 лк. Зразки товщиною наночарів 15 – 18 нм мають максимальну світлочутливість.

Необхідно відзначити, що зміна типу травника і концентрації розчину призводить до зміни динаміки росту сНПК шару, рівня пористості, співвідношення розмірів кристалітів і отворів, хімічного складу і профілю розсіювання основних домішок.

Як правило, при розробці імунобіосенсорів, що базуються на основі поверхневого плазмонного резонансу та ЕПВВ, для досягнення високої щільності іммобілізації імунних компонентів на поверхні трансдюсерної попередньо обробляють однією з хімічних сполук, серед яких найчастіше використовуються: а) сульфат декстрану; б) додекантіол; в) поліелектро-літи: гідрохлорид поліаліламіну (ПАА) і/або сульфат полістирену (ПСС) [1, 2]. Після цього поверхню трансдюсера обробляли певними речовинами для досягнення орієнтованої іммобілізації специфічних антитіл. Серед таких речовин найчастіше застосовуються: а) білок А з *Staphylococcus aureus*; б) білок G з *Staphylococcus*; в) лектини.

При розробці імунобіосенсорів, що базуються на сНПК, ми використали тільки “прямий” шлях аналізу. Це пов'язано з певними проблемами іммобілізації компонентів на поверхні сНПК та їхнього впливу на утворений сигнал. В подальшому ми плануємо детально вивчати ці ефекти.

Результати досліджень. Детальні результати аналізу мікотоксинів наведено на рисунках 5 – 7. Показано, що чутливість таких біосенсорів дозволяє визначити Т-2 мікотоксин і патулін при концентрації 10 нг/мл протягом декількох хвилин.

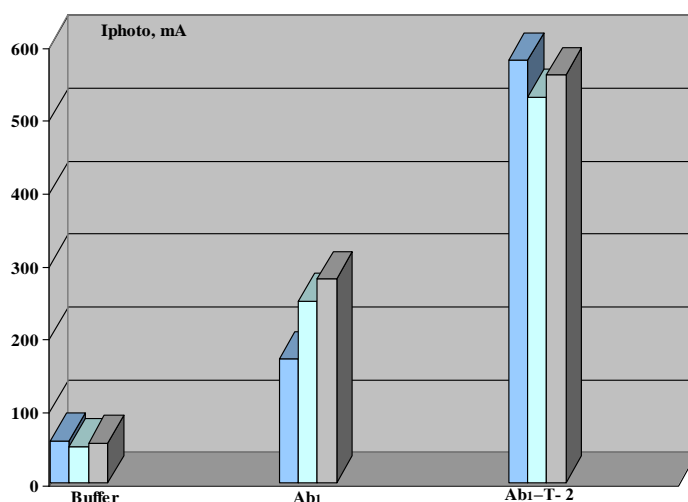
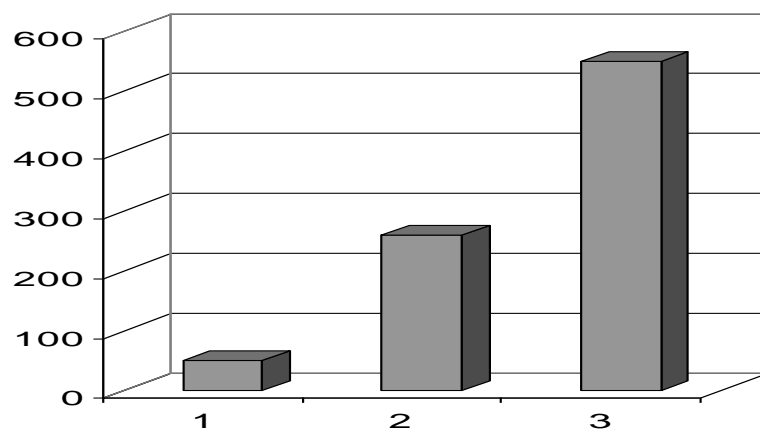


Рис. 5. Зміни фотоструму фоторезистора після додавання буфера, специфічних антитіл (Ab_1) та утворення комплексу Ab_1 T-2 мікотоксин

Загальна тривалість всіх вимірювань, включаючи іммобілізацію антитіл Ab , – близько 40 хв. Цей час може бути скорочений, якщо антитіла Ab будуть іммобілізовані заздалегідь і аналіз буде розпочинатися з нанесення мікотоксину на поверхню сНПК.

Отримані калібрувальні криві з модельних розчинів Т-2 мікотоксину і патуліну відкривають можливості практичного використання запропонованих імунобіосенсорів для визначення інших мікотоксинів, а також інших типів токсичних речовин з використанням їх специфічних антитіл Ab .



**Рис. 6. Залежність флореструму від стану поверхні сНПК:
1 – чиста; 2 – з антитілом; 3 – із специфічним антитілом і патуліном**

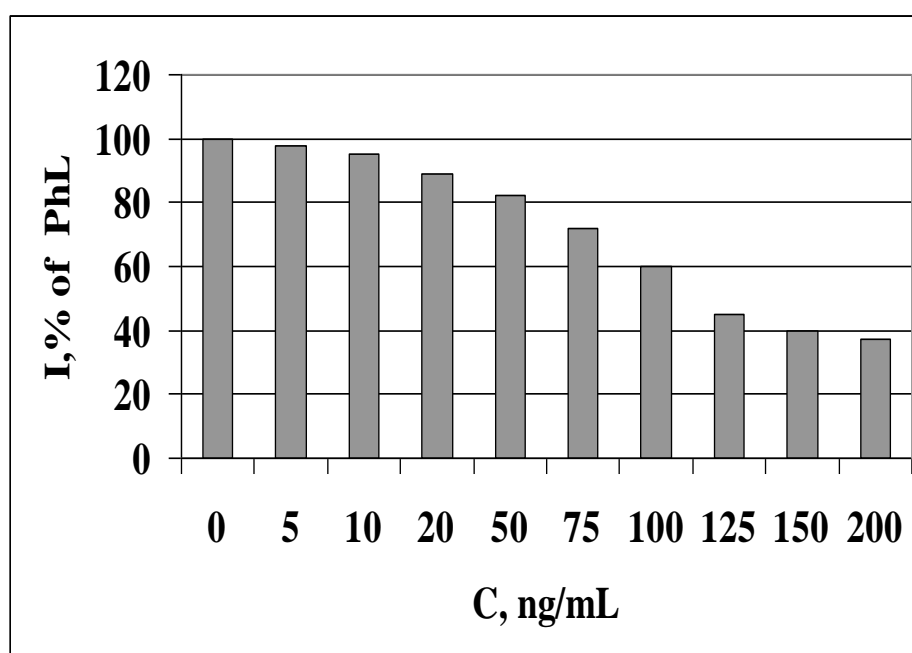


Рис. 7. Залежність сигналу імуносенсора (інтенсивність сНПКФЛ) від концентрації Т2-мікотоксину в аналізованому розчині

Відкладення ретровірусних білків на сНПК дещо підвищує рівень ФЛ, але при формуванні специфічного імунного комплексу він зменшується. Крім того, рівень зниження ФЛ залежить від концентрації специфічних антитіл Абу крові (рис. 8). Якщо ми використовували неспецифічні антитіла або сироватку бичачого альбуміну як антиген Ag, рівень ФЛ не змінювався. Чутливість аналізу ретровірусного ЛВРХ цим імунобіосенсором перевищує традиційні методики, включаючи також ELISA-метод. Оптимальне розведення сироватки крові для скринінгу лейкемії має бути не менше 1:100 або навіть 1:500. Імунобіосенсор також може використовуватися для експрес-скринінгу лейкозу шляхом аналізу молока. У цьому випадку оптимальне розведення сироватки молока має бути близько 1:20.

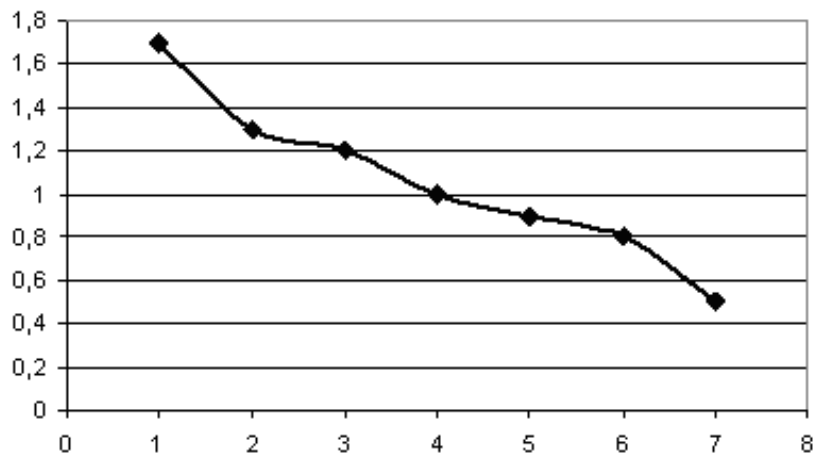


Рис. 8. Залежність інтенсивності ФЛ від концентрації специфічних антитілу досліджуваному розчині (сироватці крові хворих тварин): 1 – іммобілізовані антигени Ag; 2 – 7 – розведення сироватки крові: 1:5000; 1:1000; 1:100; 1:50; 1:10; 1:1, відповідно.

Необхідно підкреслити, що фото чутливість сНПК трохи знизилася після іммобілізації антигену Ag (сирого зразка ретровірусних білків), але додавання антитіл Ab (сироватки крові хворих корів) у розведенні 1:5000 та, зокрема, 1:1000 вона різко зменшується. На жаль, при меншому рівні розбавлення крові (від 1:100 до 1:1) фоточутливість починає знижуватися до вихідного рівня. Можливо, це пов'язано із збільшенням щільності аналізованого розчину або з іншим механізмом електронних обмінів між імунним комплексом і поверхнею сНПК.

Якщо ми брали сироватку крові від нехворої корови, рівень фотоструму не змінювався порівняно з вихідним. Така ж ситуація спостерігалася, якщо ми використовували бичачий сироватковий альбумін замість сирих зразків ретровірусних білків (рис. 9).

Таким чином, експериментальні результати дають можливість вважати, що застосування запропонованого принципу імунобіосенсора може бути дуже перспективним для різних типів біохімічної діагностики, а не лише для виявлення ретровірусної інфекції у корів. Звичайно необхідним ще є розуміння того, яким чином впливають високі концентрації білків на процес рекомбінації в сНПК.

Необхідно також зазначити, що загальний час аналізу становить кілька десятків хвилин замість кількох годин у випадку традиційного ELISA-методу або декількох днів при тесті імунної дифузії.

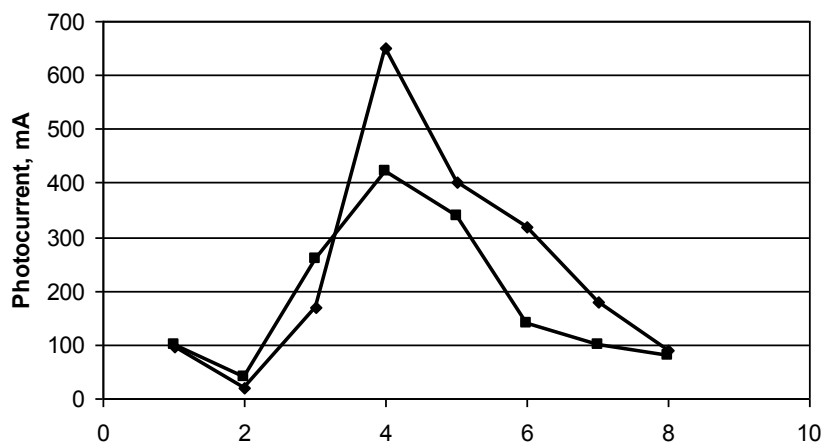


Рис. 9. Рівень фотоструму до (1) і після осадження антигену Ag (2) і антитіла Ab у різних концентраціях (3–8 – 1:5000, 1:1000, 1:100, 1:50, 1:10 і 1:1, відповідно). Дві лінії позначають два різні зразки сироватки крові

На нашу думку ФЛ у червоній області може бути пов'язаний з тунельним механізмом рекомбінації носіїв заряду при збудженні їх в нанокристалах оксиду чи поверхні. Ми не виключаємо також роль водню для генерації гасіння ФЛ. Ці висновки є результатом збігу можливих причин зниження ФЛ у результаті формування імунних комплексів на поверхні сНПК. До них належать: а) зміна оптичної щільності в розчині при формуванні специфічного імунного комплексу на поверхні сНПК; б) вплив імунних компонентів або їх взаємодії на рекомбінантний процес утворення заряду фотоструму сНПК. Як відомо, поглинання світла в довжині хвилі збудження ($\lambda = 350$ нм) та в широкому полі сНПКФЛ відсутня в розчинах антитіл Ab і антигенів Ag, а також їх комплексів.

Звичайно, також необхідно зрозуміти, яким чином впливають первинні імунні компоненти (в нашому випадку специфічні антитіла) на процес рекомбінації в сНПК. Це і буде нашим наступним завданням.

Висновки

Використання сНПК як трансдюсера сприяє створенню дуже простих у використанні та стабільних імунобіосенсорів. Утворення специфічного імунного комплексу на поверхні сНПК може бути зареєстровано шляхом вимірювання ФЛ або фотопровідності. Відповідно до отриманих результатів щодо застосування таких імунних біосенсорів для контролю вмісту мікотоксинів в об'єктах навколишнього середовища, а також для біохімічної діагностики бичачого лейкозу, можна зробити висновок, що вони відповідають всім вимогам практики, таким як чутливість, простота, швидкість аналізу та можливість його проведення в польових умовах. Ці біосенсори можуть бути застосовані для реєстрації будь-яких біохімічно значущих величин, які можуть утворювати імунний комплекс. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на вивчення механізмів біохімічної реєстрації сигналу з сНПК і технічних характеристик всіх конкретних моментів виконання аналізу.

Список літератури

1. Starodub N. Biosensors for the Determination of Mycotoxins: development, efficiency at the analysis of model samples and in case of the practical applications. Inbook:

“LectureNotesofthe ICB” / N. Starodub, I. Pylypenko, L. Pylypenko, M. Mel'nichenko, A. Nabok. – 2010. – V. 86. – P. 81-101.

2. Smirnov V. Mycotoxins: fundamental and applied aspects / V. Smirnov, F. Zajchenko, I. Rubegnjak // Modern problems of toxicology. – 2000. – №1. – P. 5-12.

3. Nabok A. Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins / A. Nabok, A. Tsargorodskaya, A. Hassan, N. Starodub // Appl. Surface Science. – 2005. – V. 246, №4. – P. 381-386.

4. Nabok A. Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods. / A. Nabok, A. Tsargorodskaya, A. Holloway, N. Starodub, O. Gojster // Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – V. 22, №6. – P. 885-890.

Приведены экспериментальные данные об эффективности использования структурированного нанопористого кремния (сНПК) в качестве трансдюсера в иммуннобиосенсорах, предназначенных для контроля ретровирусного лейкоза крупного рогатого скота (ЛКРС) и определения содержания таких микотоксинов как T2 и патулин в объектах окружающей среды.

Наноструктурированный кремний, иммуннобиосенсоры, T2 микотоксин, патулин, лейкоз, диагностика.

It will be presented the experimental results about the investigations of the efficiency of the structured nanoporous silicon (sNPS) application as a transducer in the immune biosensors designed for the control of retroviral bovine leucosis (RBL) and the determination of the level such mycotoxins as T2 and patulin among environmental objects.

Nanostructured silicon, immune biosensors, T2 mycotoxin, patulin, leucosis, diagnostics.