

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ДНК-МОДИФИЦИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

© 2015 г. И.А. Комаров, И.И. Бобринецкий, А.В. Головин*,
А.О. Залевский*, Р.Д. Айдарханов*

*Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
124498, Москва, Зеленоград, пл. Шокина, 1;*

**Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/73*

E-mail: master_kom@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.15 г.

После доработки 29.06.15 г.

Приведены результаты исследования отклика сенсорных структур резистивного типа на основе ДНК-модифицированных углеродных нанотрубок в присутствии белков тромбина и альбумина. Проведен анализ взаимодействия ДНК-аптамеров (коротких ДНК-последовательностей) с углеродными нанотрубками методами спектроскопии комбинационного рассеяния с помощью анализа сопротивления полученных структур на разных стадиях сборки сенсора. Показано, что присоединение аптамеров к нанотрубке значительно уменьшает G-пик углеродных нанотрубок и вызывает понижение сопротивления сенсорной структуры. Показано, что отклик на экспонирование белками существенно отличается для тромбина и альбумина, что дает предпосылки к реализации высокоселективного биосенсора. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при создании биологических сенсоров нового поколения, в том числе встраиваемых в персональные системы мониторинга состояния здоровья.

Ключевые слова: ДНК-аптамер, биосенсор, однослойные углеродные нанотрубки, селективность, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Использование биологических сенсоров (биосенсоров) в анализе и мониторинге состояния живых объектов является очевидным и наиболее перспективным направлением медицинской диагностики. Помимо эксплуатации биологических принципов, которые обеспечивает материал чувствительного слоя, возникает перспективная возможность персонификации данных сенсоров или точной настройки на анализируемое вещество путем отбора или «программирования» параметров сенсорного слоя. Данную возможность предоставляют отдельные последовательности ДНК в виде коротких цепочек нуклеотидов, создаваемые искусственно. Аптамеры являются более предпочтительными материалами, так как могут быть химически синтезированы с выходом до 95% от заданной последовательности нуклеотидов. Специфическая третичная структура аптамера позволяет

селективно связывать конкретный агент (низкомолекулярное вещество, белок и т.д.). При этом одной из критических задач технологии подобных биосенсоров становится создание надежного интерфейса между ДНК и системой обработки информации. В настоящий момент наиболее распространенными являются системы, создаваемые на основе микроэлектронных кремниевых технологий. В частности, углеродные нанотрубки представляют интерес для создания высокочувствительных химических сенсоров [1] для исследования электропроводящих свойств одиночных молекул [2]. Углеродные нанотрубки обладают множеством уникальных свойств, которые позволяют их рассматривать в качестве перспективного материала в различных применениях. Нанотрубки можно отнести одновременно как к представителям молекулярного мира, где свойства систем определяются свойствами конкретной молекулы, так и макромира, в котором свойства множества объектов интегрируются в общую функциональную систему. Данное свойство делает нанотрубки уникальным материалом для обеспечения пере-

Сокращения: ОСНТ – однослойные углеродные нанотрубки, 15-TBA – 5'-аминомодифицированный тромбиновый аптамер, CDI – 1,1'-карбонилдиимидазол.

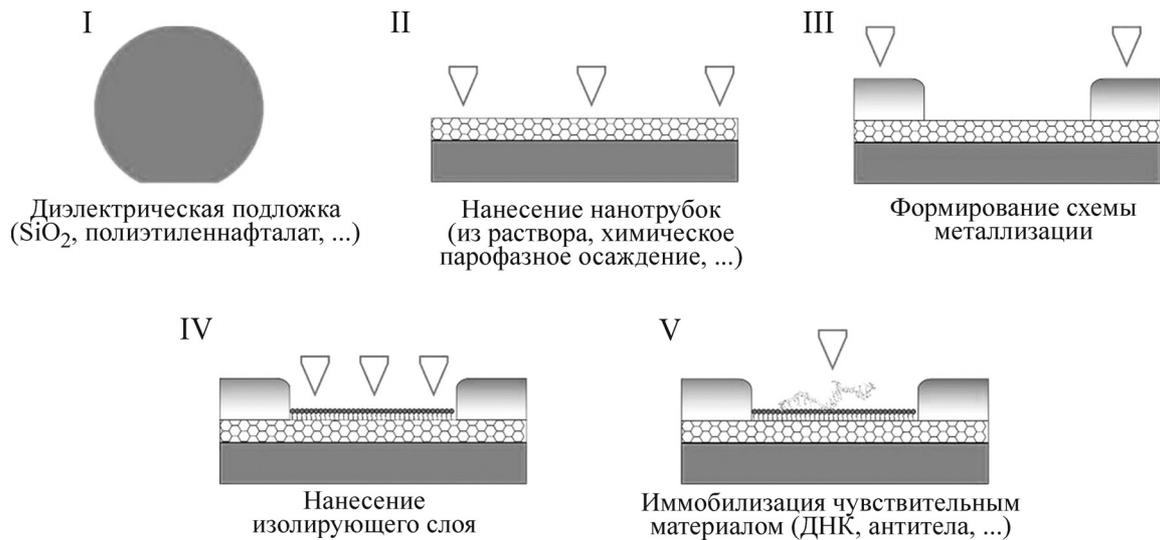


Рис. 1. Схема сборки биологического сенсора на углеродной нанотрубке.

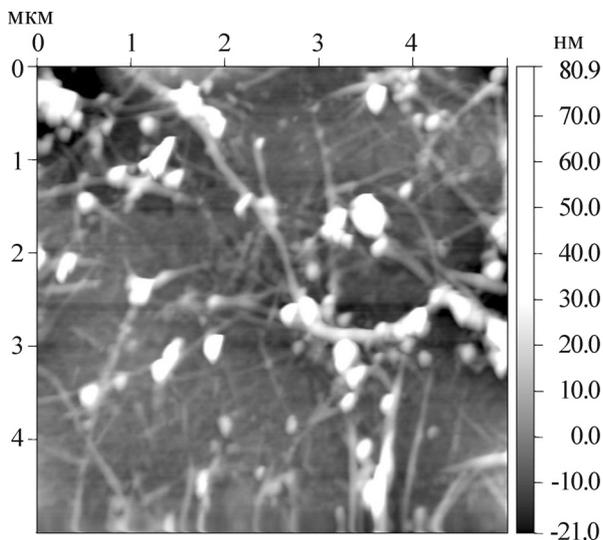


Рис. 2. Топография с сетки однослойных углеродных нанотрубок на подложке из полиэтиленнафталата.

дачи информации от молекул в современные электронные системы обработки информации. Исследование возможности организации интерфейсов на молекулярном уровне в медико-биологических приложениях является актуальным направлением в области применения углеродных нанотрубок.

Принцип работы биологического сенсора на основе углеродных нанотрубок заключается в изменении поверхностного заряда вокруг нанотрубки, что ведет к изменению ее проводимости [3]. Поверхностный заряд нанотрубки может изменяться за счет специфичных и неспецифичных взаимодействий с биологически-

ми объектами (в частности, белками) [4]. Таким образом, задача получения специфического сигнала во многом сводится к специфичности аптамера к исследуемым биологическим объектам. При этом чувствительный материал должен обладать способностью обменного взаимодействия как с исследуемым биологическим объектом, так и с нанотрубкой.

В данной работе представлены исследования по интеграции углеродных нанотрубок в микроэлектронные процессы для создания сверхтонких проводящих электродов в биологических сенсорах на основе аптамеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование биосенсора на углеродных нанотрубках. Общая схема сборки биосенсора приведена на рис. 1. Сетка углеродных нанотрубок наносится на диэлектрическую подложку (рис. 1, стадии I и II). В качестве гибких подложек использовали пленки полиэтиленнафталата (Teijin DuPont Films, Япония) размером 10×10 мм и толщиной 125 мкм. В работе использовали чистые однослойные углеродные нанотрубки (ОСНТ) 99,5 масс.%, полученные методом дугового разряда, которые были предоставлены д.ф.-м.н. А.В. Крестининым (Институт проблем химической физики РАН). Типичная длина нанотрубок, измеренная методом атомно-силовой микроскопии на приборе Солвер-ПРО (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия), составляла порядка 1000 нм (рис. 2), тем не менее в пучках длина достигает 5 мкм при диаметре пучков ~10 нм. Методика нанесения углеродных нанотрубок на поверхность под-

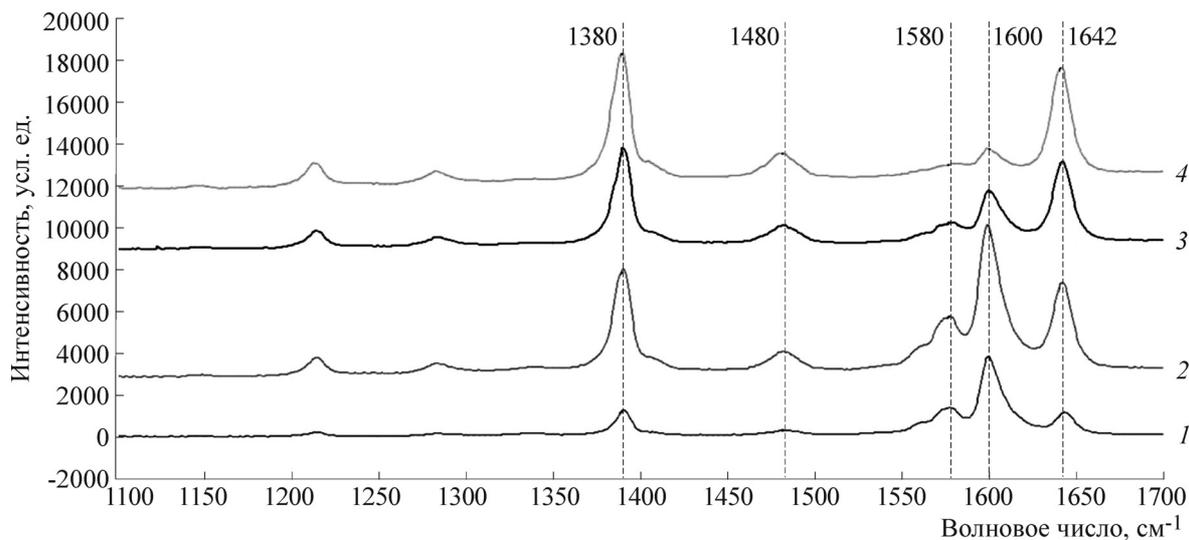


Рис. 4. Спектры комбинационного рассеяния сенсорных структур, снятые после каждой операции сборки сенсора: 1 – подложка с сеткой углеродных нанотрубок, 2 – сенсорная структура с осажденным CDI-Tween-линкером, 3 – сенсорная структура с иммобилизованными аптамерами, 4 – сенсорная структура с аптамерами после очистки в этаноламине.

Значительное изменение как вида пиков, так и их интенсивности в областях $1580\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ также связано с взаимодействием системы «CDI-Tween-аптамер» с углеродными нанотрубками и с перераспределением зарядов на нанотрубке. Сдвоенный пик $1580\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ является G-пиком углеродных нанотрубок (данный пик отвечает за тангенциальную колебательную моду C–C-связей углеродных нанотрубок), форма которого подтверждает наличие наблюдаемых на изображениях в основном пучков углеродных нанотрубок и соответствует данным ранее опубликованных работ [7]. Эффект уменьшения интенсивности данных пиков проявляется также при покрытии нанотрубок неионогенным поверхностно-активным веществом [8], в связи с чем можно предположить, что аптамер присоединяется не только к CDI-Tween-линкеру, но и непосредственно к поверхности углеродных нанотрубок. Изменение интенсивности пиков 1380 , 1480 и 1642 см^{-1} следует отнести к эффекту удаления непрореагировавших остатков CDI-Tween и аптамеров [9], при котором открывается большая площадь полиэтиленфталата в области снятия спектров.

Взаимодействие нанотрубки и чувствительного материала является сложным процессом и в зависимости от используемой конфигурации применяются два подхода: электростатическое экранирование канала ОСНТ-транзистора или непосредственное внесение (легирование) заряда с иммобилизованной на поверхности молекулы. Соответственно различие в способе передачи энергии связано со стэкинг-взаимодей-

ствием или с наличием ковалентной связи. Так как использование ковалентной связи может значительно повлиять на электронную структуру и на физическую конфигурацию углеродного остова, то основной моделью, используемой в создании биологических сенсоров, является модель электростатического экранирования за счет внесения дополнительных зарядов в приповерхностной области вокруг нанотрубок со стороны адсорбированных молекул. В частности, падение сопротивления на стадии сборки аптасенсора может быть связано с увеличением электростатического экранирования углеродных нанотрубок со стороны ДНК. Тем не менее в случае реальной сенсорной структуры следует рассматривать два механизма рассеяния носителей заряда, вносящих свой вклад в сопротивление структуры: сопротивление тела нанотрубки и контактное сопротивление между нанотрубками.

При этом в присутствии специфического агента молекула чувствительного вещества (в данном случае аптамера) изменяет свою конфигурацию. Изменение конформации молекулы приводит к уменьшению ее влияния на электронную плотность в нанотрубке. Упрощенная схема работы аптасенсора приведена на рис. 5. При этом в общем случае механизм реакции системы нанотрубка-аптамер следующий. Проводимость нанотрубки зависит от того, образует ли 15-ТВА комплекс с поверхностью нанотрубки. В отсутствие тромбина аптамер 15-ТВА находится в равновесии между состоянием в комплексе с нанотрубкой и состоянием с квадра-

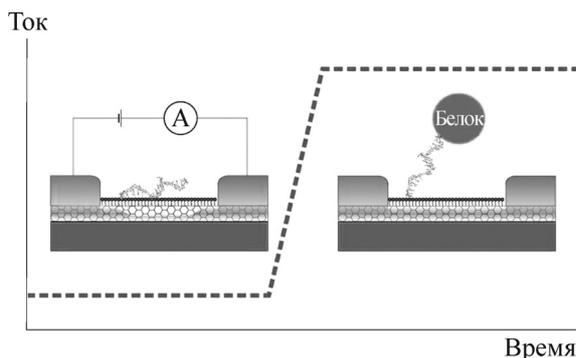


Рис. 5. Схема работы аптасенсора на основе одной нанотрубки.

плексной структурой (квадруплексная структура представляет собой тип укладки ДНК в виде четырехцепочечной спирали и выполняет функцию стабилизации молекулы аптамера, которая для исследуемого ДНК-аптамера ранее была обнаружена Р.В. Решетниковым и одним из авторов настоящей работы [10]). При этом равновесие смещено в сторону комплекса с нанотрубкой, но при возможности образовать комплекс с тромбином конформационное равновесие смещается в сторону квадруплексной структуры, которая имеет значительно меньше контактов с нанотрубкой. Именно столь значимое конформационное изменение, вероятнее всего, и приводит к изменению проводимости трубки.

Результаты экспонирования сенсорной структуры белками приведены на рис. 6. Для снятия электрического сигнала биосенсора использовали шестнадцатиканальный измеритель параметров сенсоров «ИПС 16» (ЗАО «ЭКСИС», Россия). Первоначальный сигнал в ответ на добавление тромбина очень сильный и ярко выраженный: сопротивление уменьшается на ~55%, тогда как при экспонировании альбумином сопротивление уменьшается на ~16% [5]. При этом скорость реакции сенсора в обоих случаях составляет несколько секунд. Следует отметить противоположный характер изменения сопротивления структуры, в отличие от работ по созданию сенсоров на основе одиночных ОСНТ или висящих сеток ОСНТ [11].

В общем случае влияние белков на проводимость ОСНТ-структур обеспечивается за счет комбинирования двух механизмов: электростатического экранирования вдоль тела нанотрубки и изменения барьера Шоттки в области их контакта [4]. Причиной, как и в случае уменьшения сопротивления во время сборки, могут являться контактные явления в области соединения нанотрубок между собой, вклад которых в проводимость структуры на расстояниях, превышаю-

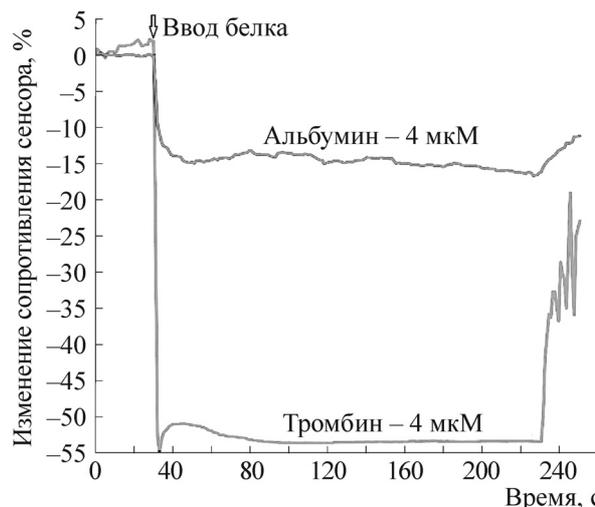


Рис. 6. Изменение сопротивления аптасенсора при экспонировании растворами тромбина и альбумина.

щих длину нанотрубок, является определяющим. Тем не менее преимущественное наличие нанотрубок в виде пучков, с одной стороны, уменьшает доступ ДНК-аптамеров ко всей поверхности нанотрубки, что снижает в целом чувствительность разрабатываемых структур.

Таким образом, при соединении нанотрубок с короткими ДНК происходят сложные процессы взаимодействия, выражающиеся в изменении энергетической структуры поверхности углеродной нанотрубки, отражающейся как в изменении сопротивления, так в изменении картины спектров комбинационного рассеяния света. Выявление и понимание данных процессов позволяет переходить от исследований к разработкам новых сенсорных и функциональных устройств, а также разработке альтернативных методов определения конформационных изменений в ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 14.575.21.0066 идентификатор проекта: RFMEFI57514X0066.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Kong, N. R. Franklin, Ch. Zhou, et al., *Science* **287**, 622 (2000).
2. K. Tsukagoshi, I. Yagi, and Y. Aoyagi, *Appl. Phys. Lett.* **85** (6), 1021 (2004).
3. A. B. Artyukhin, M. Stadermann, R. W. Friddle, et al., *Nano Lett.* **6** (9), 2080 (2006).
4. I. Heller, A. M. Janssens, J. Männik, et al., *Nano Lett.* **8** (2), 591 (2008).

5. K. F. Ahmadishina, I. I. Bobrinetskiy, I. A. Komarov, et al., *Nanotechnologies in Russia* **8** (11–12), 721 (2013).
6. H.-M. So, K. Won, Y. H. Kim, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **127** (34), 11906 (2005).
7. C. Thomsen and S. Reich, *Topics Appl. Physics* **108**, 115 (2007).
8. M. Husanu, M. Baibarac, and I. Baltog, *Romanian Reports in Physics* **60** (3), 691 (2008).
9. A. Soto and G. A. Voyiatzis, *Macromolecules* **35**, 2095 (2002).
10. Р. В. Решетников, А. М. Копылов и А. В. Головин, *Acta Naturae* **2** (4), 80 (2010).
11. Т. Ан, К. С. Kim, S. K. Hahn, and G. Lim, *Lab. Chip.* **10**, 2052 (2010).

Technological Perspectives in Developing Carbon Nanotube-based DNA-modified Biosensors

I.A. Komarov*, I.I. Bobrinetskiy*, A.V. Golovin,
A.O. Zalevsky**, and R.D. Aydarkhanov****

**National Research University of Electronic Technology, pl. Shokina 1, Zelenograd, Moscow, 124498 Russia*

***Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1/73, Moscow, 119234 Russia*

In this research we investigated the response of DNA-modified carbon nanotubes in the presence of thrombin and albumin. We analyzed aptamer-carbon nanotube interactions by Raman spectroscopy and by analyzing resistance after each step of biosensor assembly. We have shown that intensity of G-band decreases due to interconnection of aptamer and carbon nanotube and this also evaluates in decrease of sensor structure resistance. The response of the sensor exposed to thrombin and albumin differs essentially from each other. This fact serves as the prerequisite for the development of a highly selective biosensor. Results of this investigation can be used in creation of new generation of personal health monitoring systems.

Key words: DNA-aptamer, biosensor, single-walled carbon nanotubes, selectivity, Raman spectroscopy