

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ
ИМ. Н.С. ЕНИКОЛОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Кретьева Елена Алексеевна

**Разработка подходов к созданию рецепторных слоев жидкостных
биосенсоров на основе органических полевых транзисторов с
электролитическим затвором**

1.4.7 – Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель
Доктор химических наук
Агина Елена Валериевна

Москва

2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1. Органические полевые транзисторы с электролитическим затвором как перспективные устройства для обнаружения широкого спектра аналитов в жидкостях	9
1.1.1. Архитектура и принцип действия ОПТЭЗ	9
1.1.2. Полупроводниковые материалы для ОПТЭЗ.....	16
1.1.3. Рецепторные и биоузнающие слои для ОПТЭЗ.....	18
1.1.4. Детектирование отдельных молекул с использованием ОПТЭЗ.....	25
1.2. Использование полимеров для изготовления биосенсоров разных типов.....	30
1.3. Использование аптамеров для изготовления биосенсоров с различными механизмами обнаружения аналита.....	38
1.4. Использование «клик»-реакций для биофункционализации поверхности органических полевых транзисторов с электролитическим затвором	47
1.5. Изготовление многоразовых биосенсоров	54
ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ	64
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	67
2.1 Материалы для изготовления ОПТЭЗ и биосенсоров на их основе	67
2.2 Изготовление фотошаблонов и электродов методом литографии	69
2.3 Изготовление ОПТЭЗ.....	70
2.4 Методика проведения «клик»-реакции на поверхности.....	73
2.5 Обнаружение аналитов в случае ОПТЭЗ-биосенсоров с нанесенным биоузнающим слоем методом Ленгмюра-Шеффера.....	73
2.6 Характеристика поверхностей органического полупроводника, изготовленных биосенсоров и трековых мембран	74
2.7 Функционализация поверхности с помощью мембран	75
2.8 Измерение вольт-амперных характеристик устройств.....	75
2.9 Исследование механизма работы мультисенсорной платформы на основе ОПТЭЗ.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	77
3.1. Влияние полупроводниковых и рецепторных материалов на сенсорные характеристики ОПТЭЗ-устройств	77

3.1.1. Влияние химического строения и толщины полупроводникового материала на сенсорные характеристики ОПТЕЗ-устройства.....	77
3.1.2. Влияние метода формирования рецепторного слоя на сенсорные свойства ОПТЭЗ-устройств.....	87
3.1.3. Влияние химического строения ВТБТ-содержащих сополимеров на формирование рецепторного слоя ОПТЭЗ-устройств.....	97
3.2. Разработка подхода к изготовлению биосенсорных устройств на основе ОПТЭЗ для многоразового использования.....	104
3.3. Разработка подхода к изготовлению мультисенсорных устройств на основе ОПТЭЗ.....	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	139
ВЫВОДЫ.....	141
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	142
БЛАГОДАРНОСТИ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В реалиях современного мира особое внимание уделяется разработке и созданию универсальных диагностических платформ, способных обнаруживать широкий спектр биологических и химических аналитов в растворах, в т.ч. в биологических жидкостях. Такие системы позволяют существенно повысить эффективность ранней диагностики заболеваний человека, сельскохозяйственных животных и растений, а также обнаруживать загрязнение пищевых продуктов, воды и почвы различными токсинами. Ключевым фактором при создании сенсорных устройств является возможность их использования для обнаружения аналитов в жидких электролитах, в т.ч. при низких и сверхнизких концентрациях. Биосенсоры на основе органических полевых транзисторов с электролитическим затвором (ОПТЭЗ) представляют собой одну из универсальных платформ для решения поставленных задач, поскольку они адаптированы к применению в растворах электролитов, в том числе, биологических жидкостей, а также способны эффективно работать при низких напряжениях, чтобы позволяет избежать деградации биомолекул в исследуемых средах (слюна, кровь, пот, слеза, сыворотка крови). Ключевым моментом изготовления биосенсора на основе ОПТЭЗ является иммобилизация биоузнающего слоя, специфичного к определяемому аналиту, на поверхности полупроводника или затвора, призванная обеспечить специфическое связывание с целевым аналитом и гарантировать селективность изготовленного устройства. К современным методам иммобилизации можно отнести физическую адсорбцию, формирование самоорганизующегося монослоя (САМ), поэтапное осаждение биологических частиц с противоположными зарядами, биоаффинную иммобилизацию на основе меченных биотином биоузнающих элементов и стрептавидина, иммобилизованного на твердой поверхности, а также биоаффинную иммобилизацию, используемую для ориентации биомолекул на твердой поверхности. Главными недостатками, ограничивающими применение ОПТЭЗ-биосенсоров на рынке, являются недостаточная стабильность устройств, а также влияние pH и ионной силы исследуемых растворов на воспроизводимость сенсорного отклика. Таким образом, актуальной задачей является разработка подхода к созданию стабильных, в т.ч. многоазовых устройств, способных к эффективному биообнаружению аналитов непосредственно в реальных биологических жидкостях сложного состава.

Степень разработанности темы

На момент планирования цели и задач данного исследования в лаборатории молекулярных сенсорных технологий и устройств ИСПМ РАН был разработан подход к функционализации полупроводниковой поверхности ОПТЭЗ, изготовленной из смеси 2,7-диоктилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена (**C8-ВТВТ-C8**) и полистирола методом

дозировочного лезвия путем нанесения биорецепторного слоя. Биорецепторный слой наносили методом Ленгмюра-Шеффера поверх полупроводника с использованием смеси силоксанового димера [1]бензотиено[3,2-В][1]бензотиофена (ВТВТ) - 1,3-бис{11-(7-гептил[1]бензотиено[3,2-В][1]бензотио-2-ил)гексил}-1,1,3,3-тетраметилдисилоксана, **D2-Hept-VTBT-Hex** и биотинилированного производного ВТВТ (**Und-VTBT-Hex-biotin**), обеспечивая так называемые «якоря» для биоаналитов на поверхности полупроводника, что позволило создать универсальную платформу для дальнейшей биомодификации поверхности. Был продемонстрирован специфический отклик изготовленных ОПТЭЗ-устройств на вирус гриппа А (штамм H7N1). Нерешенными оставались задачи оптимизации разработанного подхода к созданию биорецепторного слоя с целью увеличения технологичности процесса и обеспечения работы устройства в широком спектре реальных биологических жидкостей, создания ОПТЭЗ-устройств, способных к многократному использованию, а также создания мультисенсорного устройства на одном чипе, что и послужило основанием для проведения данной работы.

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлась разработка подходов к созданию рецепторных (полимерных и низкомолекулярных) слоев жидкостных биосенсоров на основе органических полевых транзисторов с электролитическим затвором для селективного обнаружения и определения содержания различных вирусов в растворах, в т.ч. в биологических жидкостях. В качестве материалов для создания полупроводниковых слоев выбрали органические соединения, имеющие в своем составе сопряженное ядро на основе [1]бензотиено[3,2-В][1]бензотиофена. Рецепторными слоями служили полимерные и низкомолекулярные производные ВТВТ, содержащие биотиновый фрагмент, а также трековые мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ). Узнающими элементами для целевых и контрольных аналитов (вирусы гриппа А и Б, болезни Ньюкасла, аллантоисная жидкость) являлись ДНК-аптамеры. (Рисунок 1).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Установить влияние химического строения рецепторного и полупроводникового материалов, а также различных методов изготовления рецепторного слоя на электрические и сенсорные характеристики ОПТЭЗ;
2. Разработать подход к изготовлению биосенсорных ОПТЭЗ-устройств для многоразового использования, в т.ч. в биологических жидкостях;
3. Разработать подход к созданию мультисенсорного ОПТЭЗ-устройства на одном чипе для одновременного определения нескольких аналитов.

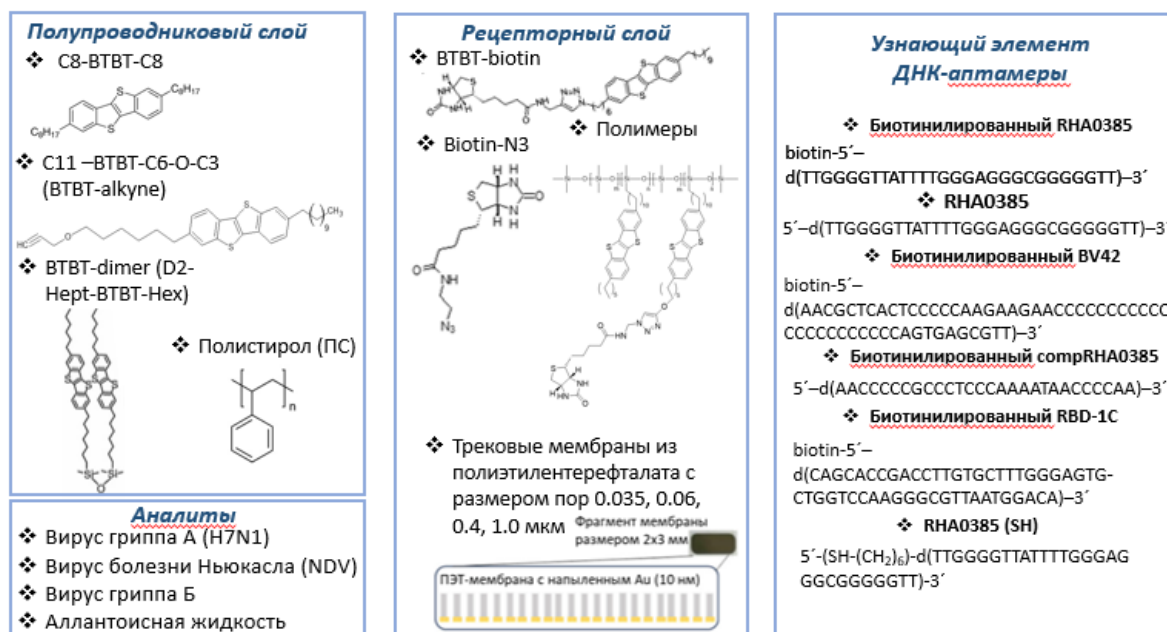


Рисунок 1 – Объекты исследования: материалы для полупроводниковых и рецепторных слоев; узнающие элементы; целевые и контрольные аналиты

Научная новизна. 1) Впервые исследовано влияние химического строения и метода формирования рецепторного слоя, а также толщины полупроводникового слоя на электрические свойства и сенсорный отклик ОПТЭЗ; 2) Разработан новый подход к нанесению рецепторного слоя ОПТЭЗ с использованием методов «клик»-химии; 3) Разработан и успешно продемонстрирован универсальный подход к изготовлению многоразовых аптасенсоров на основе ОПТЭЗ с использованием трековых мембран в качестве рецепторного слоя; 4) Впервые для изготовления сенсора на основе ОПТЭЗ использован аптамер, имеющий структуру i-мотив, что позволило создать аптасенсор, способный обнаруживать аналиты различной природы при изменении условий детектирования.

Практическая значимость работы. Разработанные подходы к изготовлению рецепторных и узнающих слоев ОПТЭЗ открывают возможности для создания жидкостных биосенсоров на основе таких ОПТЭЗ, способных обнаруживать широкий спектр биологических и химических аналитов, в т.ч. в реальных биологических жидкостях, в т.ч. с использованием одного чипа. Осуществленная разработка многоразового ОПТЭЗ-аптасенсора позволит значительно удешевить производство таких устройств без изменения набора анализируемых веществ. Представленные в работе подходы открывают путь к изготовлению универсальных, миниатюрных, многоразовых мультисенсоров для простого, недорогого экспресс-обнаружения широкого спектра аналитов.

Методология и методы исследования. Методология работы заключалась в комплексном анализе взаимосвязей между химическим строением и методами формирования рецепторных слоев, а также толщиной полупроводниковых слоев органических полевых

транзисторов с электролитическим затвором и их биосенсорными свойствами. Базовая архитектура ОПТЭЗ-устройства представляла собой трехэлектродную систему на кремниевой или стеклянной подложках, состоящую из нижних золотых контактов стока и истока, нанесенных методом вакуумного напыления, слоя органического полупроводника, и платиновой проволоки (электрода затвора), помещенной в раствор электролита. В ходе исследований полупроводниковый слой в базовой структуре модифицировали, формируя поверх него рецепторные и узнающие слои, либо используя в качестве таких слоев полимерную трековую мембрану с иммобилизованными в поры ДНК-аптамерами (Рисунок 1). Для нанесения полупроводниковых и рецепторных слоев использовали методы дозирующего лезвия (МДЛ) и Ленгмюра-Шеффера (ЛШ). Морфологию функциональных поверхностей исследовали с использованием современных методов анализа: атомно-силовой микроскопии (АСМ), поляризационно-оптической микроскопии (ПОМ), измерения контактного угла смачивания поверхности. Вольтамперные характеристики изготовленных ОПТЭЗ измеряли при помощи зондовой станции. Статистическую достоверность результатов обеспечивали путем измерения образцов, каждый из которых содержал по 20 (для кремниевой подложки) или 5 (для стеклянной подложки) единичных транзисторов на одной подложке; полученные данные усредняли.

Положения, выносимые на защиту. 1. Использование как низкомолекулярных, так и полимерных производных бензотиенобензотиофена, содержащих в своем составе фрагменты биотина, позволяет создать специфические «якоря» для иммобилизации на поверхность ОПТЭЗ стрептавидина, что открывает путь к изготовлению жидкостных биосенсоров, способных селективно обнаруживать широкий спектр биологических и химических аналитов; 2. Адекватный выбор состава рецепторного слоя и метода его нанесения позволяет создавать биосенсоры, обладающие чувствительностью, превышающей чувствительность ИФА-тестов, и демонстрирующие воспроизводимые результаты; 3. Использование трековых мембран в качестве рецепторных слоев позволяет создавать многоцветные аптасенсоры; 4. Использование в качестве узнающего элемента аптамера со структурой i-мотив позволяет создать на одном чипе систему мультицелевого обнаружения аналитов различной природы (на примере вируса гриппа А, ионов серебра и pH).

Личный вклад соискателя. Автор принимал личное участие во всех этапах выполнения работы: постановке задач, разработке плана выполнения работ, непосредственном выполнении экспериментальной части, обработке и анализе полученных данных, формулировании заключения и выводов.

Степень достоверности результатов исследования. Многократное воспроизведение полученных результатов в нескольких сериях экспериментов, а также большой набор

накопленных статистических данных подтверждают правильный выбор методик изготовления и исследования ОПТЭЗ-биосенсоров. Результаты проведенного исследования были неоднократно представлены на всероссийских и международных конференциях, а также полностью опубликованы в высокоцитируемых журналах, входящих в перечень ВАК и Web of Science, и прошли тщательную экспертную проверку рецензентов указанных журналов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 7 международных и российских научных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Международных Школах по органической электронике: IFSOE-2023, IFSOE-2024 (Москва, **2023**, Московская обл., **2024**); Международной конференции «Актуальные проблемы физики твердого тела» (Минск, **2023**); Всероссийской научной конференции МФТИ (Москва, **2024**); Всероссийских Школах-конференциях по биосовместимой электронике и робототехнике (Каспийск, **2023**, Петрозаводск, **2024**, Псков, **2025**)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 2 - в журналах первого квартиля.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. P.A. Shaposhnik, E.Y. Poimanova, A.A. Abramov, A.A.Trul, D.S. Anisimov, **E.A. Kretova**, E.V. Agina, S.A. Ponomarenko. Applying of C8-BTBT-based EGOFETs at different pH values of the electrolyte // Chemosensors – 2023. - Vol. 11. – P.74. (IF=3.7; Q2).
2. E.Y. Poimanova, E.G. Zavyalova, **E.A. Kretova**, A.A. Abramov, A.A.Trul, O.V. Borshchev, A.K. Keshek, S.A. Ponomarenko, E.V. Agina. Quantitative Detection of the Influenza a Virus by an EGOFET-Based Portable Device // Chemosensors – 2023. - Vol. 11. – P.464. (IF=3.7; Q2).
3. E.Y. Poimanova, **E.A. Kretova**, A.K. Keshek, E.V. Andreev, A.N. Nechaev, K.A. Prusakov, K.G. Aldarov, D.V. Basmanov, A.I. Akhmetova, I.V. Yaminsky, S.A. Ponomarenko, E.G. Zavyalova, E.V. Agina. A universal approach to the fabrication of reusable EGOFET-based aptasensors with track-etched membranes for biorecognition layers// J. Mater. Chem. B – 2025. - Vol. 13. – P.4681-4692. (IF=5.8; Q1).
4. **E.A. Кретьова**, Е.Ю. Пойманова, М.С. Скоротецкий, Е.Г. Завьялова, С.А. Пономаренко, Е.В. Агина. Биорецепторный слой, полученный методом «клик»-химии на поверхности органических полевых транзисторов с электролитическим затвором // Известия Академии наук. Серия химическая – 2025. – Т. 74, №11. – с. 3589-3601. (IF=1.7; Q3).
5. E.Y. Poimanova, **E.A. Kretova**, A.K. Keshek, A.T. Trul, E.G. Zavyalova, E.V. Agina. Single-chip multitarget detection by egofet-based aptasensor // J. Mater. Chem. B. – 2026. Vol. 14. - P. 2543–2555 (IF=5.8; Q1).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Органические полевые транзисторы с электролитическим затвором как перспективные устройства для обнаружения широкого спектра аналитов в жидкостях

Приоритетной задачей органической биосенсорики является обнаружение и определение содержания широкого круга аналитов в водных средах, в т.ч. в биологических жидкостях. Органические полевые транзисторы с электролитическим затвором (ОПТЭЗ) являются ключевыми объектами исследования в области биосенсорики. Ряд преимуществ ОПТЭЗ, таких как стабильность в водной среде, работоспособность при низких напряжениях, не разрушающих биомолекулы, а также способность преобразовывать аналоговую информацию в цифровой сигнал и усиливать ее, определяют их значимость в данной научной области [1-3]. В связи с этим, актуальным направлением, активно развивающимся во всем мире, является разработка и оптимизация архитектур ОПТЭЗ для целей решения наибольшего количества задач, стоящих перед биосенсорикой.

В данном разделе литературного обзора будут рассмотрены различные способы изготовления ОПТЭЗ и принципы, лежащие в основе их функционирования. Также будут перечислены различные материалы, используемые при изготовлении биосенсоров на основе ОПТЭЗ, и определены критерии, позволяющие выбрать наиболее подходящие материалы для создания эффективных устройств. Особое внимание будет уделено функциональным рецепторным и узнающим слоям, а также способам их формирования при изготовлении ОПТЭЗ-биосенсоров, поскольку именно рецепторный/узнающий слой может послужить как преимуществом устройств, так и ограничить их использование с требованием существенной оптимизации.

1.1.1. Архитектура и принцип действия ОПТЭЗ

Органические полевые транзисторы с электролитическим затвором представляют собой подкласс органических электролитических транзисторов (ОЭТ), объединяющих два типа устройств со схожей архитектурой, но с различными механизмами работы – ОПТЭЗ и органические электрохимические транзисторы (ОЭХТ) (рисунок 2). Оба типа устройств состоят из слоя органического полупроводника на непроводящей подложке и проводящих контактов (сток и исток), а также электрода затвора, отделенного от полупроводника слоем электролита [4]. Как правило, небольшое количество жидкого электролита помещают в специальный резервуар, который крепят к поверхности полупроводника, или на поверхность полупроводника наносят слой твердого электролита (полимер, ионную жидкость или ионный

гель). Затем затворный электрод погружают в слой электролита. В случае твердого электролита затворный электрод наносят методом вакуумного испарения или магнетронного распыления [5].

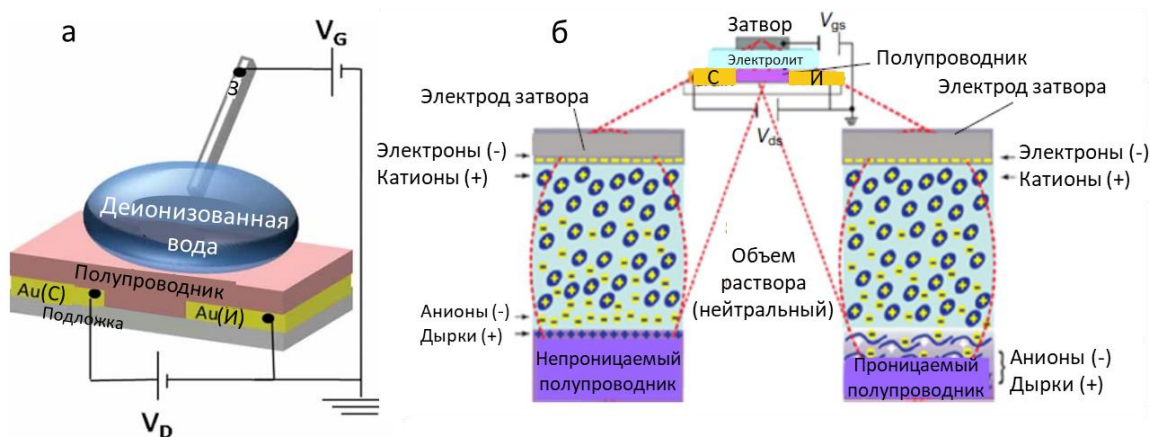


Рисунок 2 – Схематическое изображение ОЭТ (а) и иллюстрация принципа действия ОПТЭЗ и ОЭХТ (б) [5]

Основное различие в архитектуре ОЭТ и традиционных органических полевых транзисторов (ОПТ) заключается в том, что в ОЭТ используют проводящие растворы или твердый электролит вместо твердого диэлектрического слоя, применяемого в ОПТ. Функционирование ОЭТ основано на том же принципе, что и у обычных ОПТ, механизм работы которых может быть описан следующим образом. Пока на затвор ОПТ не подано напряжение, через канал транзистора от истока к стоку может протекать лишь очень слабый электрический ток благодаря собственной проводимости полупроводника. Когда на затвор ОПТ подано напряжение (в стандартной конфигурации напряжение измеряется относительно заземленного контакта истока), диэлектрик поляризуется, и свободные носители заряда в полупроводнике начинают двигаться к границе раздела полупроводник/диэлектрик, чтобы компенсировать эквивалентный заряд на границе раздела затвор/диэлектрик. Это приводит к образованию проводящего канала на границе раздела полупроводник/диэлектрик. Напряжение на затворе, необходимое для создания проводящего канала, называется пороговым напряжением. Если теперь подать напряжение на контакты стока и истока, носители заряда инжектируются из электрода истока и начинают двигаться внутри токонесящего канала транзистора – возникает электрический ток [5,7].

В случае ОЭТ при приложении отрицательного напряжения на электрод затвора, погруженный в раствор электролита, положительные ионы собираются на границе раздела затвор/электролит, а отрицательные – на границе органический полупроводник/электролит, формируя два двойных электрических слоя (ДЭС) на соответствующих границах раздела фаз [5,8]. Для водных растворов электролитов ёмкость ДЭС достигает десятков мкФ/см², что

позволяет ОЭТ работать при напряжениях менее 1 В и обеспечивает возможность биологического неразрушающего сенсинга.

Механизмы работы ОПТЭЗ и ОЭХТ различаются тем, что миграция заряда в токопроводящем канале в ОПТЭЗ (как и в ОПТ) происходит только за счет приложенного электрического поля. В ОЭХТ приложенное электрическое поле дополнительно вызывает обратимую инжекцию ионов из электролита в полупроводник (рисунок 2б), поэтому в работающем ОЭХТ присутствуют два типа носителей заряда. Исследования показали, что такая инжекция сопровождается окислительно-восстановительной реакцией, описываемой следующим соотношением (для анионов и полимерного полупроводника) [5,9]:



где P^0 – активный полимер, Q^- – анионы, e^- – электрон.

Именно ОПТЭЗ представляют собой перспективную платформу для создания жидкостных биосенсоров. В первую очередь это связано с использованием в качестве функциональных материалов в ОПТЭЗ органических полупроводников, обладающих высокой стабильностью не только на воздухе, но и в растворах, включая физиологические растворы и биологические жидкости, а также высокой биосовместимостью, что позволяет использовать такие устройства в биомедицине. Другим ключевым преимуществом является способность ОПТЭЗ работать при низких напряжениях (0,1-1В), что с одной стороны снижает энергопотребление и делает их пригодными для создания портативных устройств, а с другой – дает возможность работать с биомолекулами в неразрушающем режиме [10]. Эти факторы также крайне важны при разработке переносных и имплантируемых систем мониторинга состояния организма. Кроме того, ОПТЭЗ могут быть изготовлены на различных недорогих одноразовых подложках, таких как бумага [11] или полимерные материалы [12] с использованием простых растворных методов изготовления. Эти особенности позволяют масштабировать их изготовление и обеспечить невысокую стоимость производства, а следовательно, и конечного продукта. Также возможна интеграция ОПТЭЗ-устройств в микрофлюидные системы, что расширяет возможность их использования для создания компактных и высокопроизводительных биоэлектронных сенсорных устройств, способных интегрироваться с живыми тканями [13].

ОПТЭЗ могут иметь различную архитектуру в зависимости от расположения электрода затвора относительно канала транзистора (Рисунок 3). Так, в простейшем случае электрод затвора может находиться над каналом биосенсора, а в качестве электролита могут быть использованы биологические жидкости различной природы (рисунок 3а). Такая архитектура актуальна для сенсоров, используемых для обнаружения ионов [14], анализа нейроморфных систем [15], электрофизиологических измерений [16]. Для изготовления на основе ОПТЭЗ

высококчувствительных безметочных биосенсоров часто используют подход биофункционализации электрода затвора [17] (рисунок 3б) или полупроводникового канала (рисунок 3в) [18,19]. Такие биосенсоры, как правило, содержат белковые узнающие слои, например, ДНК и РНК зонды [20], ферменты или антитела [21-23], способные избирательно связываться с целевым аналитом. Кроме того, описаны варианты архитектур ОПТЭЗ, когда биорецепторный слой не контактирует ни с затвором, ни со слоем полупроводника, а находится непосредственно в электролите. Такой подход применяют для контроля целостности клеточных мембран [24], а также для селективного обнаружения ионов [25,26]. Менее распространена архитектура устройств, включающая ионопроводящую мембрану, которая располагается между электродами в электролите и отделяет электрод затвора от канала с полупроводниковым слоем, разделяя электролит на два отсека (рисунок 3г). Такая конфигурация может быть использована для записи сигналов нервных окончаний, когда есть необходимость в нахождении полупроводникового слоя в непосредственном контакте с тканями человека [27]. Ещё один вариант расположения затвора, так называемый «плавающий» затвор, при котором ОПТЭЗ состоит из двух отсеков с электролитом, соединенных золотым электродом с двумя контактными площадками (рисунок 3ж). Такие затворы используются для измерений электроактивности клеток [28].

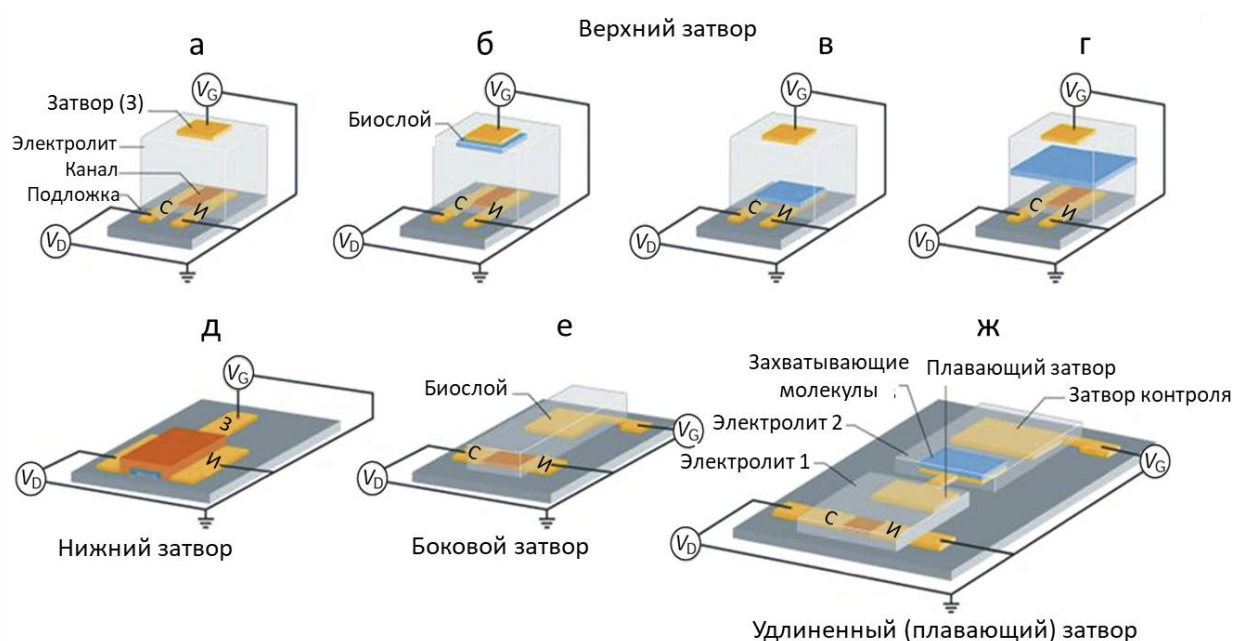


Рисунок 3 – Основные архитектуры ОПТЭЗ с различными компонентами устройств [29]: с верхним затвором (а); с верхним затвором и биоузнающим слоем на затворном электроде, затвор представляет собой поляризуемый электрод (б); с верхним затвором и с биоузнающим слоем на транзисторном канале, затвор может быть поляризуемым или неполяризуемым электродом (в); с верхним затвором и биоузнающим слоем, входящим в состав электролита, биослой разделяет электролит на два отсека, затвор может быть поляризуемым или неполяризуемым электродом (г); с нижним затвором (д); с боковым затвором (е); с удлиненным (или плавающим) затвором (ж) [30]

Пример биофункционализации полупроводникового слоя узнающими элементами представлен в работе [31], где было предложено изготовление безметочного иммуносенсора на основе ОПТЭЗ для обнаружения С-реактивного белка (рисунок 4). Узнающий слой изготавливали путём физической адсорбции моноклонального антитела на С-реактивный белок (СРБ) на поверхность органического полупроводника поли-3-гексилтиофена (РЗНТ). В качестве блокирующего агента использовали дополнительный неионогенный гидрофильный полимер, предотвращающий неспецифические взаимодействия и обеспечивающий лучшую ориентацию антител, иммобилизованных на поверхности РЗНТ. Разработанная технология иммобилизации не требовала предварительной обработки поверхности ОПТЭЗ, а сама биофункционализация занимала не более 30 минут. С помощью поверхностного плазмонного резонанса было показано, что частичное покрытие поверхности полупроводника (примерно на 23%) адсорбированными молекулами антител позволяет наиболее эффективно определять СРБ. Электрические характеристики ОПТЭЗ-иммуносенсора были сопоставимы с характеристиками ОПТЭЗ-устройства на основе чистого РЗНТ, а полученная калибровочная кривая СРБ была линейной в диапазоне концентраций от 4 пМ до 2 мкМ. Относительное стандартное отклонение отдельных калибровочных точек, измеренных на иммуносенсорах, изготовленных на разных чипах, составляло от 1 до 14 %, а предел обнаружения был установлен на уровне 2 пМ (220 нг/л). Иммуносенсор был успешно использован для обнаружения биомаркера СРБ в клинически значимой матричной сыворотке.

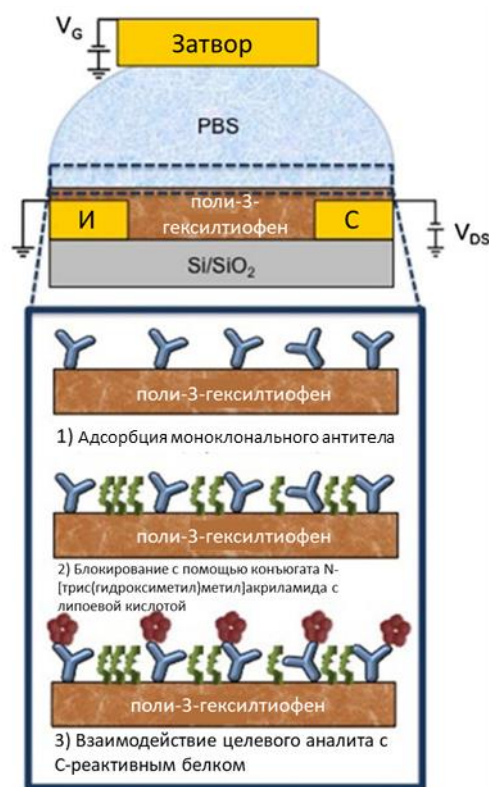


Рисунок 4 - Схематическая структура ОПТЭЗ-иммуносенсора для обнаружения С-реактивного белка

Спустя несколько лет аналогичный способ обнаружения был продемонстрирован в работе [31] для определения прокальцитонина, являющегося маркером сепсиса. Антитела, специфичные к прокальцитонину, были иммобилизованы на поверхности поли-3-гексилтиофена путем прямой физической адсорбции с последующей обработкой бычьим сывороточным альбумином (БСА) как блокирующим агентом для предотвращения неспецифической адсорбции. Биоузнающие слои, состоящие из антител и БСА, служили для селективного захвата целевого аналита прокальцитонина. Весь процесс изготовления иммуносенсора был быстрым, занимая в общей сложности 45 минут до начала определения аналита. Изготовленный иммуносенсор продемонстрировал хорошие электрические характеристики, сопоставимые с характеристиками ОПТЭЗ на основе чистого РЗНТ, а его предел обнаружения составил всего 2,2 пМ и находился в диапазоне, имеющем клиническое значение. Относительное стандартное отклонение отдельных точек калибровочных данных, измеренных на иммуносенсорах, изготовленных на разных чипах, было ниже 7%. Разработанный иммуносенсор продемонстрировал высокую селективность к аналиту прокальцитонину, что было подтверждено контрольными экспериментами.

Пример биофункционализации затвора узнающими элементами представлен в работе P. Seshadri с соавт., где был разработан ОПТЭЗ с модулируемой емкостью для обнаружения и исследования хиральных взаимодействий белков, связывающих одоранты (БСО) и обеспечивающих таким образом процессы периферического обоняния (рисунок 5) [32]. Периферические процессы обоняния зависят от БСО, однако их роль в распознавании летучих химических веществ была не до конца ясна. При этом, как и любой полевой транзистор, ОПТЭЗ представляет собой мультипараметрическое устройство с широким набором потенциальных параметров сенсорного отклика, в качестве которых может использоваться наиболее подходящая (чувствительная к минимальному изменению среды) из электрических характеристик. Авторы предложили чувствительный и количественный метод измерения слабых взаимодействий с нейтральными энантиомерами, которые по-разному связываются с БСО, закрепленными на затворе ОПТЭЗ через самоорганизующийся монослой. В работе описано взаимодействие S(+)- и R(-)- карвона с производным БСО - pOVP-mutant-F88W, и обнаружен отклик с помощью ОПТЭЗ. Выходной ток транзистора менялся в зависимости от емкости белкового слоя, что позволило фиксировать даже небольшие изменения с высоким отношением сигнал/шум благодаря наличию усилителя сигнала. Сенсор оказался очень чувствительным, поскольку выходной ток транзистора определяется малой емкостью белкового монослоя, которая незначительно изменяется при образовании комплексов лиганд-белок. Были рассчитаны величины свободной энергии, а также изменения емкости ОПТЭЗ, связанные с процессом связывания одорантов, что позволило определить наличие

конформационных событий, связанных со связыванием одоранта с БСО. Этот метод позволил точно измерить энергии связи с величиной до $1,1 \pm 0,5$ кДж/моль, возникающие при взаимодействии нейтральных энантиомеров с БСО, закрепленным на самоорганизующемся монослое. Анализ свободной энергии и изменения емкости подтвердил, что связывание S-(+)-карвона вызывает конформационные изменения в БСО, чего не происходит при взаимодействии с R-(-) энантиомером. Разработанные ОПТЭЗ с модулируемой емкостью открывают путь к изучению сверхслабых молекулярных взаимодействий в поверхностно-связанных белково-лигандных комплексах с помощью подхода, сочетающего расчет биохимических и электронных термодинамических параметров.

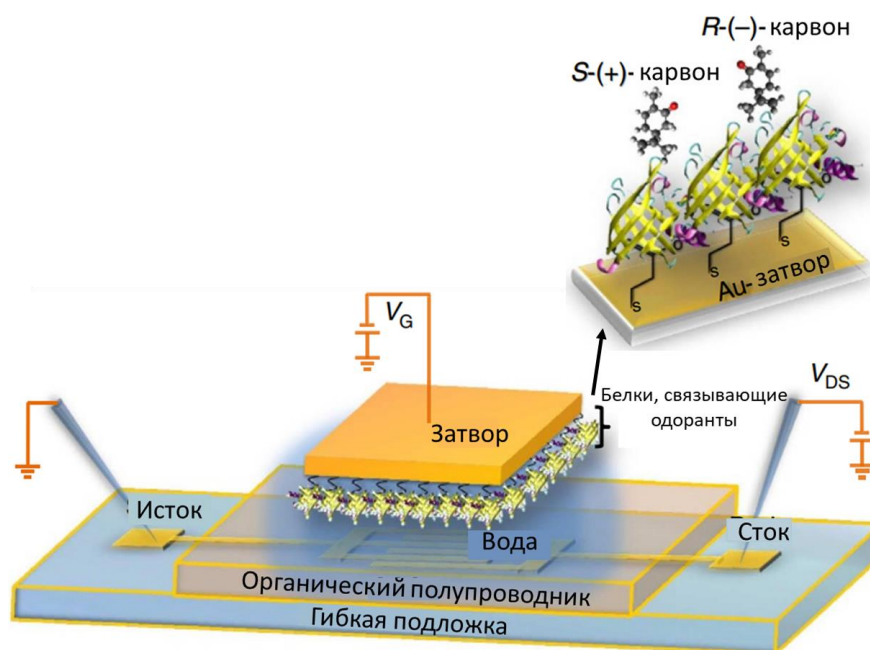


Рисунок 5 – Архитектура ОПТЭЗ, содержащего белки, связывающиеся с одорантами на электроде затвора

Примером использования нетипичной архитектуры ОПТЭЗ может служить работа [32], в которой описана особенная архитектура ОПТЭЗ с двумя затворами и общим каналом, разработанная для количественного определения одной из цепей РНК (miRNA-21) в растворе. Олигомер miRNA-21 был выбран в качестве соответствующего прототипа для изучения способности ОПТЭЗ обнаруживать образование дуплекса зонд-мишень в случае почти комплементарного соответствия. Разработанное устройство позволяет измерять дифференциальный отклик между двумя электродами, один из которых работает в качестве чувствительного электрода, а другой - в качестве электрода сравнения. Оба электрода погружают в электролит над каналом транзистора. Гибридизация олигонуклеотида в пикомолярном диапазоне приводит к значительному снижению тока, протекающего через канал транзистора. Сигнал устройства регистрируют при различных напряжениях на затворе, причем наибольшая чувствительность наблюдалась в сублинейной области. Предел

обнаружения изготовленного сенсора составил 35 пМ. Обнаружено, что свободная энергия связывания, относящаяся к гибридизации олигонуклеотида на поверхности ОПТЭЗ, примерно на 20% ниже, чем для аналогичного процесса, протекающего в растворе. Данный факт указывает на частично ингибирующее действие поверхности, а также на протекание конкурирующих реакций, связанных с отсоединением зонда и возникновением неконтролируемой гибридизации непосредственно в растворе даже при низкой концентрации, а также с наличием реакции гибридизации, затрудненной поверхностью. Для подтверждения стабильности биоузнающего слоя были проведены измерения функционализованного затвора методом импедансной спектроскопии, а метод поверхностного плазмонного резонанса позволил подтвердить эффективность гибридизации, равную 69%, при взаимодействии зонда с мишенью. В целом, мультиплексные ОПТЭЗ-биосенсоры с двойным затвором действительно могут представлять собой перспективную область для создания интегрированных устройств для распознавания генов, позволяя анализировать данные с высокой достоверностью и проводить измерения между образцами. Такой подход очень важен, например, не только для безметочного обнаружения биомаркеров типа miRNA, но и для различения точечных мутаций вирусов и микроорганизмов, что особенно актуально в условиях современных эпидемий.

1.1.2. Полупроводниковые материалы для ОПТЭЗ

Что касается полупроводниковых материалов для сенсоров на основе ОПТЭЗ, то на их выбор в основном влияют условия эксплуатации при низких рабочих напряжениях в присутствии водных электролитов, поэтому используемые органические полупроводники должны обладать хорошими полупроводниковыми свойствами, высокой степенью кристалличности в тонкой пленке, химической стабильностью в водной среде, а также иметь в составе функциональные группы для связывания узнающих элементов. Следует отметить, что возможны варианты архитектур ОЭТ-биосенсоров, для которых иммобилизация узнающих элементов реализуется через дополнительный рецепторный слой, как это описано в [34,35]. Различие в механизмах действия ОПТЭЗ и ОЭХТ накладывает дополнительные требования на полупроводниковые материалы. Так, материалы для ОПТЭЗ должны обладать высокой электрохимической стабильностью и образовывать гладкие пленки, в то время как полупроводники для ОЭХТ должны демонстрировать обратимую способность к окислению/восстановлению и иметь пористую структуру пленки, способную к набуханию. Примеры низкомолекулярных и полимерных полупроводниковых материалов для создания ОПТЭЗ и ОЭХТ приведены на рисунке 6.

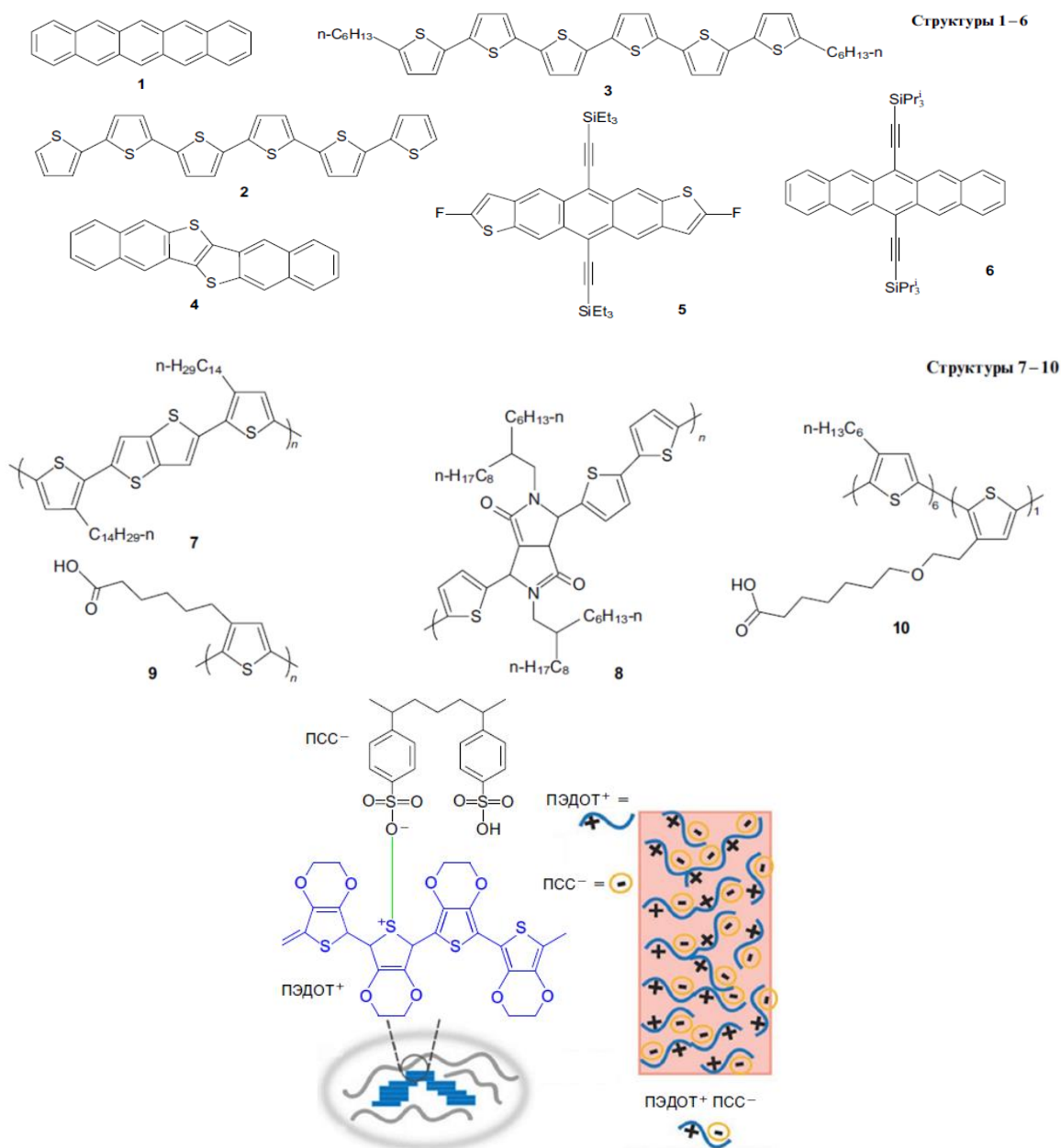


Рисунок 6 – Низкомолекулярные (а) и полимерные (б,в) полупроводниковые материалы для создания ОПТЭЗ (а,б) и ОЭХТ (в)

Хотя нелегированные органические полупроводниковые материалы являются амбиполярными (т.е. они способны обеспечивать как дырочную, так и электронную проводимость в зависимости от работы выхода контактов в устройстве), в большинстве экспериментов с ОЭТ-биосенсорами используется только один инертный контактный материал - золото. Большинство полупроводниковых материалов, используемых в органической электронике, демонстрируют дырочную проводимость в сочетании с золотыми контактами. Поэтому ОЭТ обычно представляют собой органические транзисторы р-типа. Материалы n-типа крайне редко используются в ОЭТ, поскольку они за редкими исключениями гораздо менее стабильны на воздухе и в присутствии электролита. Для изготовления ОПТЭЗ традиционно используют достаточно большой набор органических

полимерных, олигомерных и низкомолекулярных полупроводников (рисунок 6 а,б), тогда как для изготовления ОЭХТ в основном используют только комплекс поли(3,4-этилендиокситиофена) с полистиролсульфоокислотой (ПЭДОТ:ПСС) (рисунок 6в) [36]. В качестве примеров наиболее распространенных материалов для создания полупроводниковых слоев ОПТЭЗ можно привести поли(3-гексилтиофен-2,5-диил) (РЗНТ) [21,37,38] и 2,7-диоктилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофен [39], а также графен [40]. Перечисленные материалы предоставляют широкие возможности для создания ОПТЭЗ-биосенсоров различного назначения.

1.1.3. Рецепторные и биоузнающие слои для ОПТЭЗ

Что касается использования ОПТЭЗ для биообнаружения широкого спектра аналитов различной природы, таких как белки, пептиды, вирусы и т.д., то для реализации такого типа детектирования необходимо дополнительно интегрировать в структуру ОПТЭЗ биоузнающий слой [41,42]. Этот слой может быть расположен как на электроде затвора, так и непосредственно в канале транзистора. Биологическая компонента ОПТЭЗ-биосенсора состоит из узнающих элементов, специфичных к целевому аналиту, в качестве которых могут выступать ферменты (оксидоредуктазы, изомеразы, лиазы, лигазы, трансферазы, гидролазы), некаталитические белки (антитела), антигены (белки, полисахариды, входящие в состав вирусов, микроорганизмов, опухолевых клеток), ДНК-аптамеры, а также цельные клетки [30]. Следует отметить, что в процессе сенсорного измерения узнающий биослой подвергается воздействию аналита, который во многих случаях представляет собой раствор электролита с высокой ионной силой, что накладывает дополнительные требования на материалы узнающего слоя и методы его формирования для достижения стабильности в процессе сенсорных измерений. В том случае, если узнающий слой расположен на затворе, применяют поляризуемый электрод, при этом сопротивление затвора будет велико, и им можно пренебречь. В случае, если узнающий слой расположен на канале транзистора, можно использовать как поляризуемые, так и неполяризуемые электроды затвора.

Чаще всего узнающим элементом в составе ОПТЭЗ часто служат антитела. Так, в работе [43] описан высокопроизводительный ОПТЭЗ-биосенсор на основе поли{2,2'-[(2,5-бис(2-октилдодецил)-3,6-диоксо-2,3,5,6-тетрагидропирроло[3,4-с]пиррол-1,4-диил)]дитиофен-5,5'-диил-альт-тиено[3,2-b]тиофен-2,5-диил}a (PDBT-co-TT) с подвижностью носителей заряда $0.44 \text{ см}^2/\text{Вс}$, и антителами к альфафетопротеину в качестве узнающих элементов, иммобилизованными на поверхность ОПТЭЗ за счет физисорбции (рисунок 7). Сенсор обеспечил возможность безметочного быстрого определения биомаркера

рака печени - альфа-фетопротеина с пределом обнаружения 0,15 нг/мл (при диагностическом пороге 10 нг/мл) и возможностью количественного анализа в течение всего 45 минут, что значительно превосходит традиционные методы исследования, такие как иммуноферментный анализ (ИФА), требующий нескольких часов. Авторы ожидают, что благодаря технологичности изготовления этот биосенсор может комбинироваться с интегральными схемами для обеспечения одновременного обнаружения нескольких аналитов в будущем.

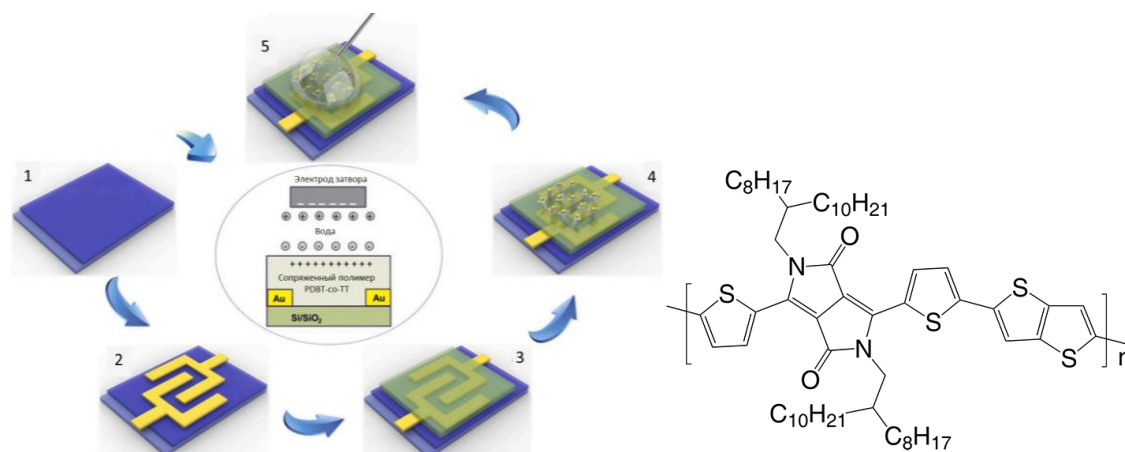


Рисунок 7 – Методика изготовления ОПТЭЗ-биосенсора к альфафетопротеину и химическая структура использованного сопряженного полупроводникового полимера

В качестве примера ОПТЭЗ-биосенсоров с цельными клетками в качестве узнающих элементов можно привести работу [43], где были изготовлены ОПТЭЗ на основе низкомолекулярного органического полупроводника 2,8-дифтор-5,11-бис(триэтилсилилэтинил)антрадифтенофена (diF-TES-ADT) в смеси с полистиролом (рисунок 8). Показано, что ОПТЭЗ обладали высокой чувствительностью и были способны к длительной работе в электрофизиологических приложениях, успешно регистрируя внеклеточный потенциал кардиомиоцитов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCs-CMs), на протяжении нескольких недель. Была также продемонстрирована возможность проведения высокочувствительных тестов на цитотоксичность фармацевтических препаратов, таких как норадреналин и верапамил, с использованием описанных ОПТЭЗ. В работе сделан вывод о том, что ОПТЭЗ на основе смесей органических полупроводников и диэлектриков являются эффективными биоэлектронными преобразователями для внеклеточной электрической регистрации возбудимых клеток и тканей и представляют собой перспективную альтернативу электрохимическим транзисторам.

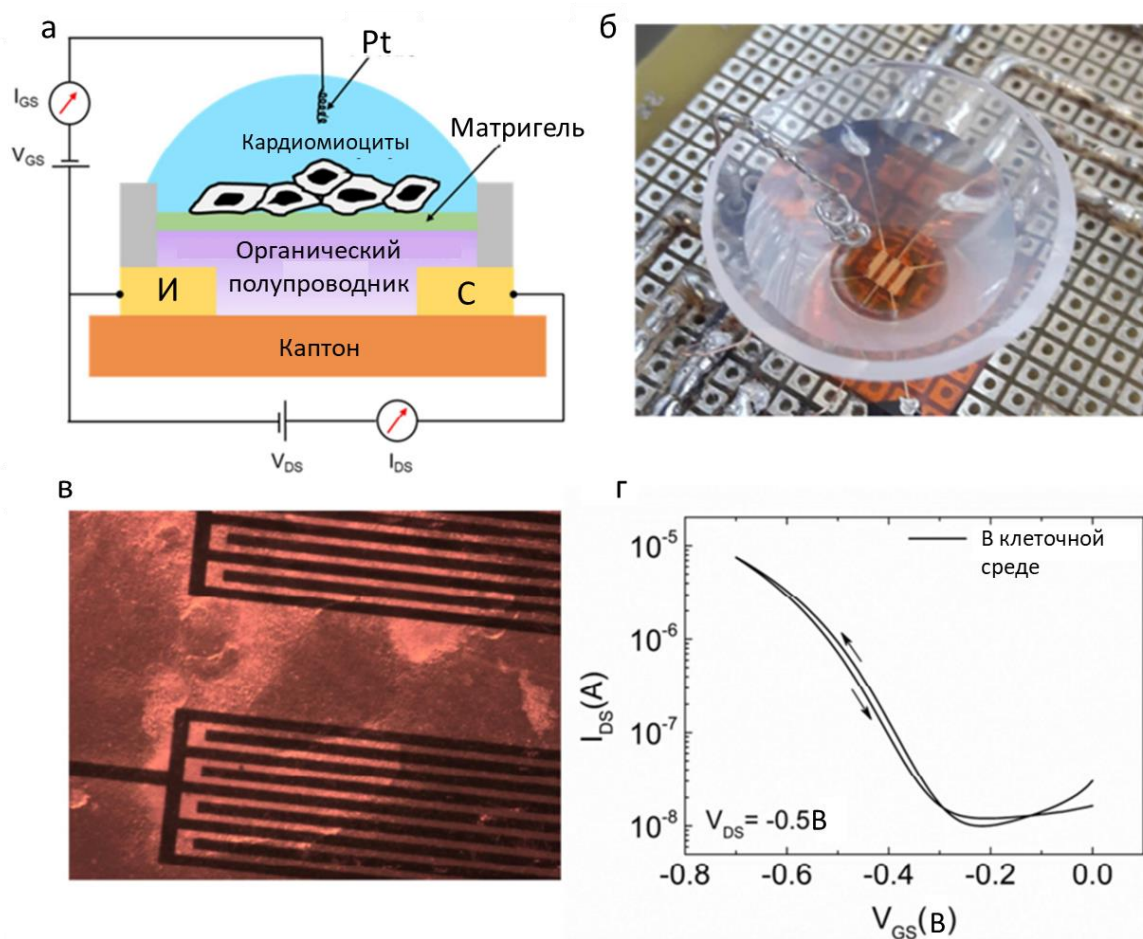


Рисунок 8 – (а) Схематическое изображение ОПТЭЗ с клетками hPSCs-CMs, выращенными в виде кластера; (б) Фотография экспериментальной установки для внеклеточной регистрации. (в) оптическая микрофотография hPSCs-CMs на поверхности ОПТЭЗ; (г) Типичные характеристики тока исток-сток I_{DS} в зависимости от напряжения затвор-исток V_{GS} транзистора, работающего в клеточной среде, при $V_{DS} = -0,5$ В, стрелками указаны прямое и обратное измерение вольт-амперной характеристики

В качестве узнающих элементов достаточно часто используют также ДНК-аптамеры – короткие олигонуклеотиды, способные узнавать широкий круг мишеней, в т.ч. белки, вирусы, бактерии, онкомаркеры, раковые клетки, лекарства, взрывчатые вещества, тяжелые металлы. Аптамеры не подвержены денатурации и не требуют особых условий хранения, а их высокая специфичность позволяет работать в биологических системах без сложной пробоподготовки, например, с кровью, сывороткой и т.п. Сенсоры на основе аптамеров - аптасенсоры обладают низкими пределами обнаружения вплоть до обнаружения единичных молекул аналитов. Так, ОПТЭЗ-аптасенсор на основе графена [44] с аптамерами в качестве узнающих элементов позволил обнаружить токсин сибирской язвы на уровне аттомолярной концентрации. Аптамеры, использованные в составе устройств, обладали высоким сродством к антигену сибирской язвы, что и позволило улучшить предел обнаружения, динамический диапазон и чувствительность разработанного аптасенсора по сравнению с сенсорами на основе антител. Увеличение числа захваченных молекул привело к большему сдвигу порогового напряжения,

использованного в качестве параметра отклика, что обеспечило чувствительность к концентрациям аналита в диапазоне от 12 аМ до 120 фМ. Дополнительное усиление сигнала было достигнуто с помощью вторичных наночастиц золота, которые увеличили степень допирования в канале транзистора. Это позволило авторам снизить предел обнаружения до 1,2 аМ и увеличить минимальное изменение порогового напряжения в три раза. Кроме того, было показано, что использование более коротких аптамерных зондов обеспечивает более эффективное детектирование белков в растворах аналитов с более высокой ионной силой.

В литературе описаны многочисленные примеры исследований, где селективное узнавание целевого аналита обеспечивалось за счет его ковалентного связывания с самоорганизующимся рецепторным монослоем на поверхности ОПТЭЗ. Так, Casalini с соавторами опубликовали работу, в которой впервые был описан ОПТЭЗ для обнаружения [45] дофамина как нейромедиатора, регуляция которого играет важную роль в передаче клеточного сигнала [46,47]. В качестве чувствительного элемента была использована поверхность золотого электрода, модулирующая электрохимический потенциал водного раствора, а следовательно, и потенциал на границе раздела полупроводник/электролит. Самоорганизующийся монослой цистеина и 4-формилфенилбороновой кислоты на золотом электроде обеспечил селективное ковалентное связывание дофамина благодаря этерификации между 4-формилфенилбороновой кислоты и дофамином [48]. В результате адсорбции благодаря цвиттер-ионной структуре бороновой кислоты и аминокислотной группы образуется большой поверхностный диполь, влияющий на электрические характеристики (емкость и пороговое напряжение) изготовленного ОПТЭЗ, что позволило продемонстрировать потенциал для детектирования дофамина на пикомолярных концентрациях, значительно превосходя ранее разработанные аналоги [49]. Исследование подтвердило, что предложенный ОПТЭЗ функционирует как потенциометрический датчик за счет изменения электрохимического потенциала границы раздела водный раствор/затвор, при этом важную роль играют самоорганизующиеся слои, благодаря которым достигается ковалентное связывание аналита с зондом. Разработанный ОПТЭЗ основывается на неокислительном принципе работы, что позволяет эффективно преодолеть ограничения, характерные для окислительных методов в присутствии интерферирующих агентов, обладающих окислительно-восстановительным потенциалом. В частности, такое решение продемонстрировало высокую устойчивость к негативному влиянию мешающих компонентов (сопутствующих веществ), что значительно расширяет область его применения и повышает точность аналитических данных.

Использование самоорганизующихся рецепторных монослоев может обеспечить, в т.ч. иммобилизацию на поверхность ОПТЭЗ других узнающих элементов за счет реакций специфического взаимодействия. Так, в работе [50] была изучена иммобилизация антител,

таких как анти-иммуноглобулины G и M (анти-IgG и анти-IgM), на золотые электроды за счет использования самоорганизующихся монослоев в качестве модельной системы для дальнейшей разработки иммуноаналитических систем (рисунок 9).

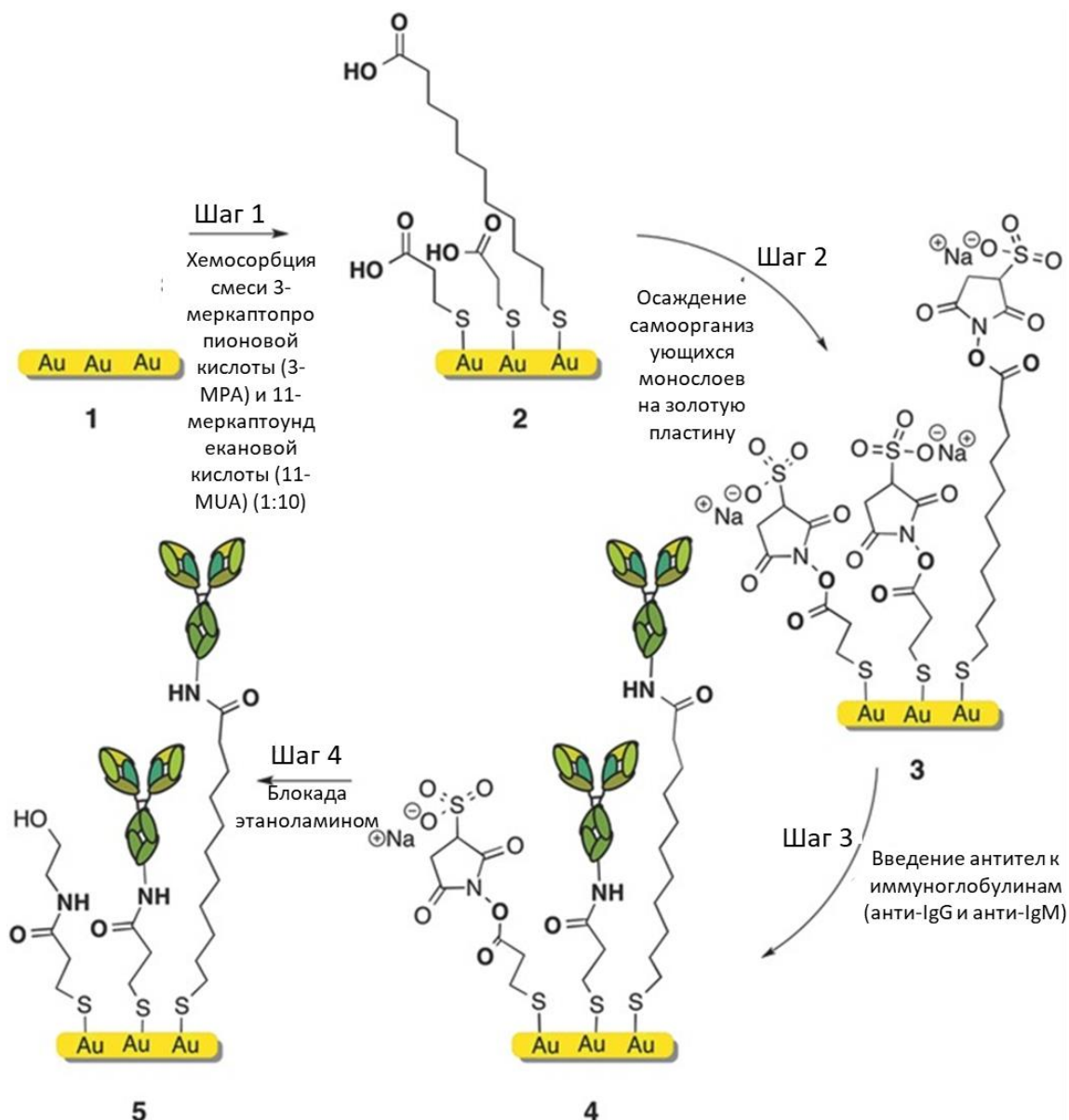


Рисунок 9 – Поэтапная функционализация для получения биомодифицированных золотых электродов

Процесс состоял из нескольких этапов: на первом на поверхности золота формировали самоорганизующийся монослой из смеси 3-меркаптопропионовой и 11-меркаптоундекановой кислот в соотношении 10:1. Выбор смеси карбоновых кислот с различной длиной алкильной цепи авторы объяснили ранее показанной эффективностью иммобилизации биомолекул на таком слое. Далее поверхность монослоя обработали N-этил-N'-(3-диэтиламинопропил)карбодиимидом/сульфо-N-гидроксисульфосукцинимидом натрия, содержащими в своем составе карбоксильные группы, что позволило сформировать на поверхности золота рецепторный монослой, на который затем были иммобилизованы

выбранные антитела (anti-IgG и anti-IgM) за счет ковалентного связывания amino-групп антител с карбоксильными группами монослоя. Непрореагировавшие реакционные группы блокировали при помощи этиламина. Полученные узнающие слои исследовали методами РФЭС, АСМ, ЦВА и электрохимического поверхностного плазмонного резонанса, подтвердив ковалентное присоединение антител с высокой воспроизводимостью. Визуализация топографии узнающего слоя с помощью АСМ выявила наноструктуры, размеры которых соответствовали фактическому размеру белка. На основании измерений поверхностного плазмонного резонанса расчетное покрытие поверхности антителами к IgG и IgM составило ≈ 124 и ≈ 150 нг/см² соответственно, что соответствует покрытию 80% и 97% общей поверхности. Использование модифицированного антителами золота в качестве затвора ОПТЭЗ позволило продемонстрировать работоспособность устройства в жидкости, при этом функционализация затвора привела к изменению электрических характеристик ОПТЭЗ, в частности, порогового напряжения, что подтвердило перспективность разработанной биочувствительной платформы для создания биосенсоров.

Еще одним способом иммобилизовать на поверхность полупроводникового слоя ОПТЭЗ узнающие элементы служит биотин-стрептавидиновое взаимодействие, которое также может быть реализовано с использованием самоорганизующегося рецепторного монослоя. Так, в работе [34] описана функционализация поверхности полупроводникового слоя ОПТЭЗ путем нанесения дополнительного рецепторного слоя силоксанового димера бензотиенобензотиофена, содержащего в качестве концевой фрагмента биотин, методом Ленгмюра-Шеффера (ЛШ). При этом производное с биотиновым фрагментом является «якорным» при последующей иммобилизации на него стрептавидина путем биотин-стрептавидинового взаимодействия и дальнейшего взаимодействия стрептавидина с узнающим элементом, в качестве которого использовали биотинилированный аптамер, способный селективно связывать вирус гриппа А. Функциональность предложенного концепта была доказана на примере вируса гриппа А и вируса болезни Ньюкасла (NDV) в целевых и контрольных экспериментах (рисунок 10).

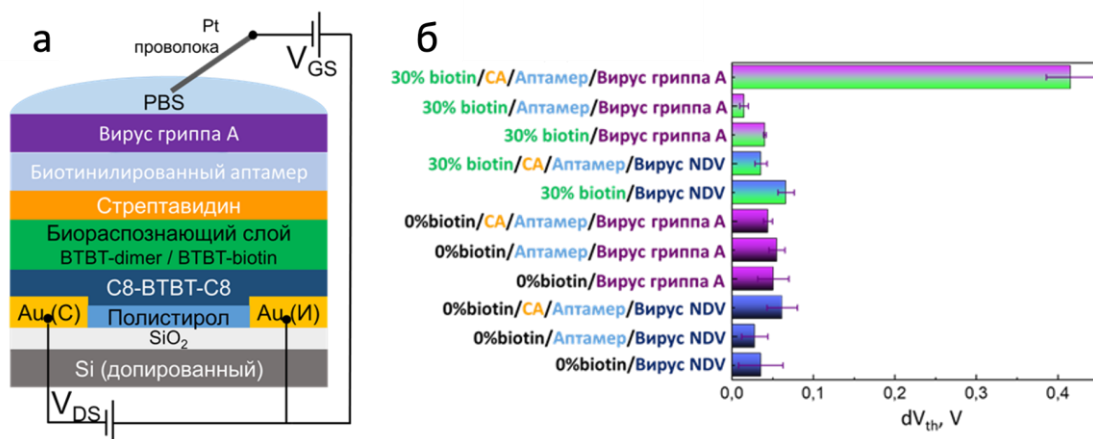


Рисунок 10 – Схематическое изображение ОПТЭЗ-биосенсора (а) и сенсорный отклик устройства, собранного в разных конфигурациях, на вирус гриппа А и контрольный вирус NDV (б)

ОПТЭЗ зачастую используют для обнаружения электрохимически неактивных аналитов, например, белков различного строения. Впервые ОПТЭЗ устройства были использованы для определения цитокинов, например, интерлейкина IL-4 группой С. Касалини (рисунок 11) [51]. Распознавание связывания антитело-антиген является ключевой задачей, лежащей в основе функционирования биосенсорных платформ. В биосенсорах, работающих в безметочном режиме, процессы, протекающие на границе раздела фаз, являются сложными и трудно контролируемыми на молекулярном уровне. В данной работе авторы использовали для исследования участков электрода, предназначенного для иммунодетекции воспалительного цитокина, а именно интерлейкина-4 (IL-4), метод молекулярного масштаба, такой как одномолекулярная силовая спектроскопия. Статистический анализ кривых зависимости силы от расстояния позволил количественно оценить ключевые параметры распознавания, включая вероятность, характерную длину, энергию сцепления и временные рамки взаимодействия.

Результаты данной работы позволили оптимизировать работу ОПТЭЗ как иммуносенсора на интерлейкин. Были сопоставлены две различные стратегии иммобилизации антител к IL-4 на золотом затворном электроде: антитела связывались либо с гладкой пленкой His-меченого белка G (PG)/Au, либо с самоорганизующимся монослоем 6-аминогексантиола (HSC6NH2) на золоте с помощью глутарового альдегида. Наиболее чувствительный ОПТЭЗ с пределом обнаружения до 5 нМ был получен при первой стратегии функционализации. Этот результат коррелирует с наибольшей вероятностью (30%) специфических событий связывания, обнаруженных методом силовой спектроскопии на электродах с первой функционализацией, по сравнению с 10% вероятностью на электродах со второй функционализацией. В частности, это демонстрирует, что Ab/PG/Au обеспечивает наибольшую плотность ориентированных антител, доступных для распознавания.

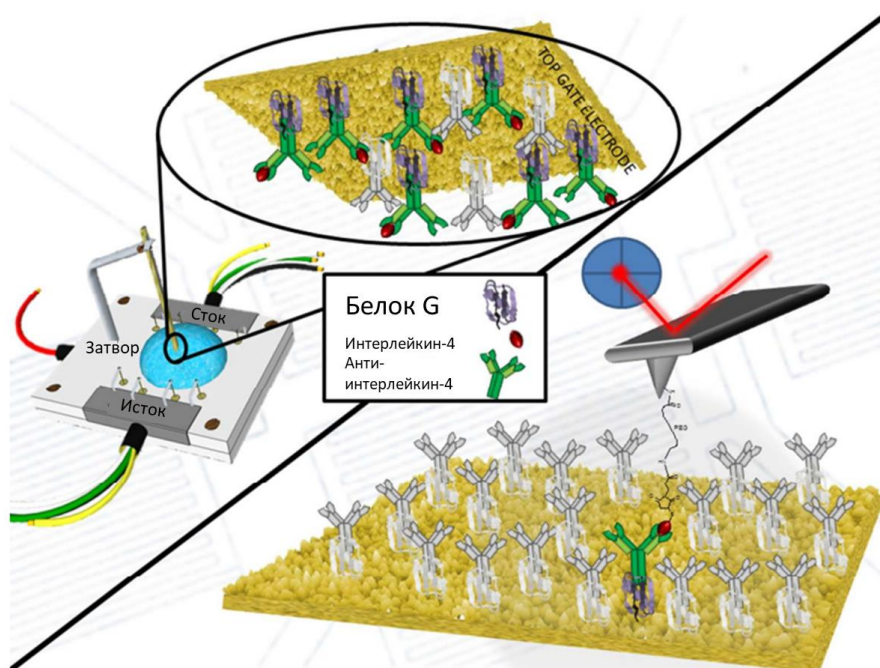


Рисунок 11 – Зондирование взаимодействий антитело-антиген

1.1.4. Детектирование отдельных молекул с использованием ОПТЭЗ.

Обнаружение отдельных молекул с использованием ОПТЭЗ-биосенсоров является одним из ключевых достижений этой области биосенсорики, поскольку предполагается, что оно позволит прецизионной медицине войти в повседневную клиническую практику. В целом среди существующих на сегодняшний день методов детектирования отдельных молекул лишь немногие полностью пригодны для сверхчувствительного безметочного анализа биологических жидкостей. В последние годы в области сенсорного обнаружения отдельных молекул наблюдается значительный прогресс, обусловленный развитием передовых технологий, таких как флуоресцентная микроскопия с низким уровнем фонового шума, плазмонные и электрические нанопреобразователи [52]. Такие системы демонстрируют исключительную чувствительность, позволяя детектировать аналиты на уровне наномолярных концентраций и выше.

Что касается места ОПТЭЗ в области обнаружения единичных молекул, то оно представлено очень перспективным подходом к архитектуре ОПТЭЗ - SiMoT-технологией создания сенсоров (“Single Molecule with a large Transistor”), которая расшифровывается как технология обнаружения единичной молекулы большим транзистором (рисунок 12) и была впервые предложена в 2018 году в работе Л.Торси с соавт. [53]. Технология основана на самособирающихся монослоях полупроводника и биоузнающего слоя. Было показано, что аналит даже при очень низкой концентрации за несколько минут связывался в активном слое

таких устройств, что позволило достичь рекордных пределов обнаружения в безметочном обнаружении белков и других биомаркеров для ранней медицинской диагностики [30].

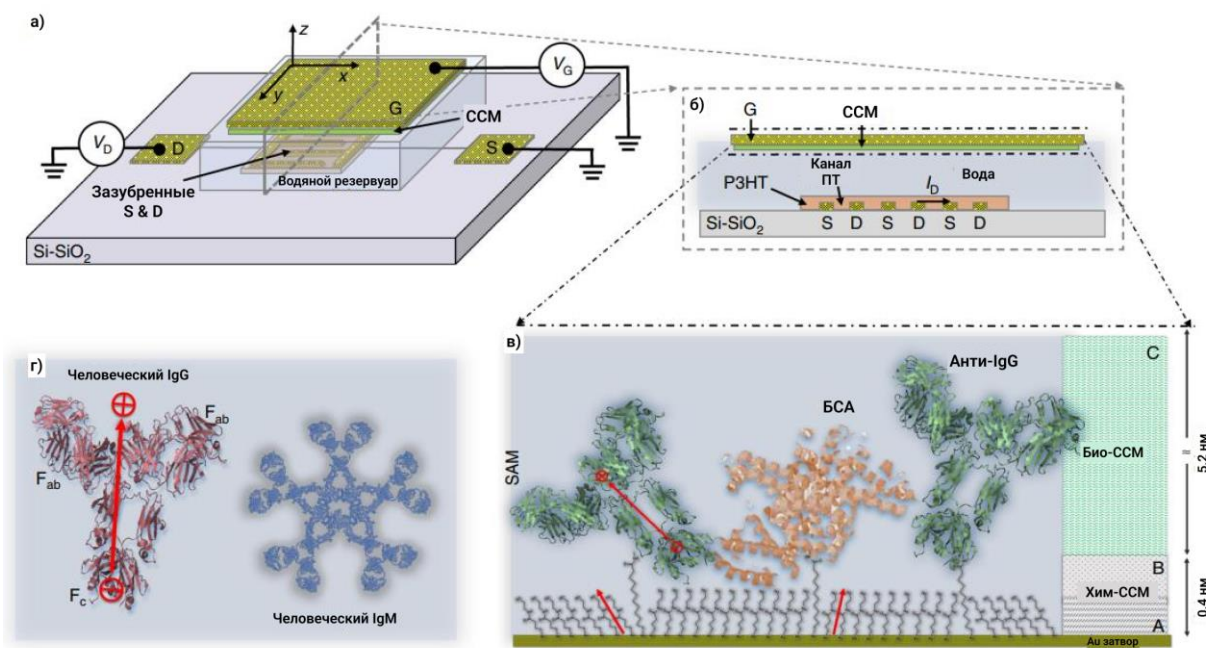


Рисунок 12 – ОПТЭЗ для SiMoT-технологии обнаружения единичной молекулы. (а) Схематическое изображение ОПТЭЗ с (б) поперечным сечением области канала транзистора. Контакты истока (S) и стока (D) нанесены на подложку из кремния, покрытую диоксидом кремния и затем органическим полупроводниковым слоем из поли(3-гексилтиофен-2,5-диил)а (ПЗНТ). (в). Структура биоузнающего самоорганизующегося монослоя (масштаб не соблюден) и дипольные моменты разных компонентов функциональных слоев (г) [30]

В качестве параметра сенсорного отклика ОПТЭЗ использовали пороговое напряжение, изменение которого фиксировали при изменении концентрации аналита. На рисунке 13б приведены сдвиги порогового напряжения SiMoT-транзистора, а также уменьшение работы выхода затвора на каждой стадии функционализации поверхности полупроводника и после связывания аналита в диапазоне концентраций от 60 до $6 \cdot 10^6$ зептамоль.

Механизм действия SiMoT технологии был предложен только в 2023 году в работе Ди Франко с соавт. [54], в которой биофункционализированный электрод затвора был описан с т.з. изменения его поверхностного потенциала. Было показано, что связывание всего лишь 10^8 и менее иммуноглобулинов приводит к изменению поверхностного потенциала у 10^8 антигенов, нанесенных в качестве узнающего слоя. Авторы предлагают следующий механизм действия: аффинное связывание молекулы аналита с одним захватывающим антителом вызывает распространение электростатических (дипольных) изменений вдоль всего узнающего слоя, что в конечном итоге влияет на другие антитела, по принципу домино [30].

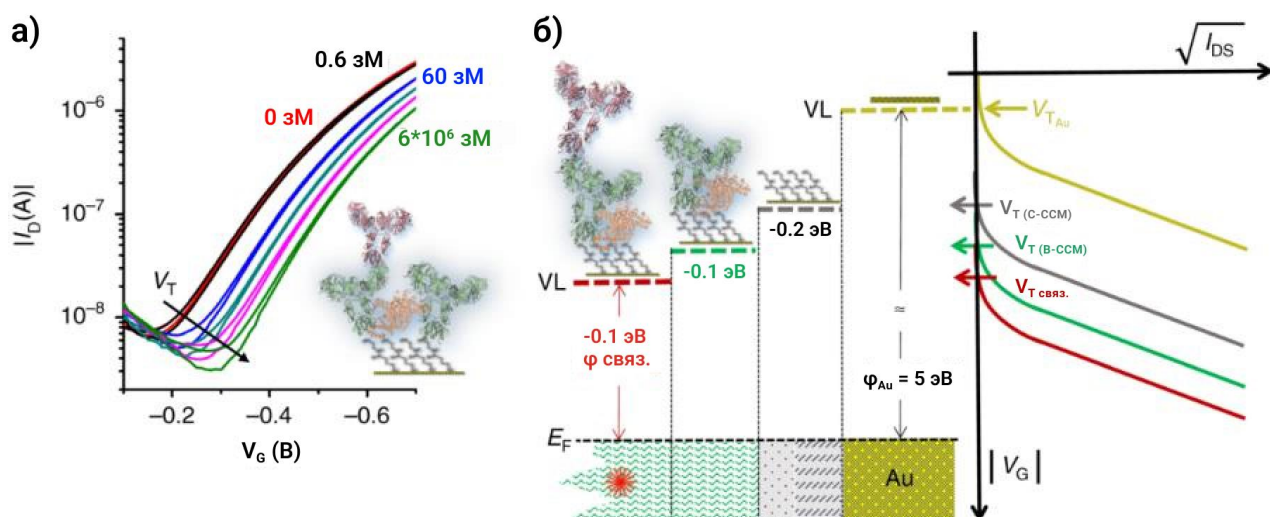


Рисунок 13 – Сенсорные измерения ОПТЭЗ при обнаружении единичной молекулы. а)

Передаточные характеристики ОПТЭЗ. Самособирающийся слой из anti-Human-IgG, инкубированный на затвор в фосфатном солевом буфере (красная кривая) последовательно подвергали воздействию стандартных растворов IgG в концентрациях от 6 зМ (черная кривая), 60 зМ (синяя кривая), 600 зМ (темно-зеленая кривая), 6700 зМ (пурпурная кривая) и 6,67·10⁶ зМ (светло-зеленая кривая). Уменьшение работы выхода затвора (ϕ) на последовательных стадиях функционализации и после связывания аналита (б) и корреляция с измеренными сдвигами порогового напряжения (V_T) в сторону отрицательных напряжений на затворе. E_F — электрохимический потенциал затвора, V_L — уровень вакуума

В работе [55] Tricase A. с соавт. изучали конформационную реорганизацию самособирающегося монослоя N-(2-гидроксиэтил)-3-меркаптопропанамида на поверхности электрода затвора при приложении электрического поля в зависимости от протокола изготовления слоя, используя цикло-вольтамперометрию и рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию. Было обнаружено, что приложение электрического поля, происходящее в процессе измерения сенсорного отклика ОПТЭЗ вызывает конформационную перестройку монослоя благодаря сильным водородным связям межцепных взаимодействий -NH/-COOH, что, вероятно, лежит в основе «эффекта домино», обеспечивающего сверхвысокую чувствительность SiMoT-технологии [30].

В работе [37] представлено безметочное селективное обнаружение отдельных молекул с помощью самоорганизующихся монослоев анти-иммуноглобулинов, а также впервые продемонстрировано обнаружение иммуноглобулина М. Изготовленный сенсор являлся высокоселективным, что было подтверждено путём измерения дифференциальных откликов соответствующих биомаркеров иммуноглобулина М или иммуноглобулина G, взаимодействующих с антителами к одному из иммуноглобулинов, иммобилизованными на самоорганизующиеся монослои. Описан механизм обнаружения отдельных молекул в электрическом поле с точки зрения усиленного полевого эффекта и распространения электростатических взаимодействий, связанных с сетью электростатических водородных связей, что подтвердило механизм, предложенный в работе Ди Франко с соавт.

На данный момент SiMoT-технология подтверждает свою работоспособность и широко распространяется в области биосенсорики, используясь многими исследовательскими группами [37,42,56-58].

Органические полевые транзисторы с электролитическим затвором являются перспективной платформой для мультисенсорных массивов благодаря возможности обнаружения нескольких целевых аналитов одним чипом путем иммобилизации разных узнающих элементов на разные части подложки при модификации полупроводникового слоя или за счет использования нескольких затворов, модифицированных разными узнающими элементами [30]. Благодаря высокой емкости двойных электрических слоев значительный полевой ток возникает при напряжении затвора всего 0,5 В, что позволяет работать с биологическими молекулами без их разрушения. Кроме того, большим преимуществом мультисенсорных ОПТЭЗ является возможность биомолекулярного анализа в реальных биологических жидкостях, таких как слюна, кровь, сыворотка, слезь, пот или моча. Так, Genco с соавт. [59] предложили портативную биоэлектронную платформу мультиплексного сенсорного массива на основе ОПТЭЗ, использующего технологию SiMoT, для скрининга предраковых состояний поджелудочной железы (рисунок 14). Устройство включало в себя одноразовый картридж размером 8×12 , аналогичный картриджу для иммуноферментного анализа (ИФА), с массивом ОПТЭЗ-сенсоров и многоразовый считыватель, интегрирующий специализированный чип, работающий через программное обеспечение, установленное на подключенном через USB смарт-устройстве. Картридж был дополнен 3D-печатной крышкой сенсорного затвора.

Используя портативную 96-луночную биоэлектронную сенсорную матрицу для анализа отдельных молекул в жидкости кист и плазме крови, была обследована группа из 47 пациентов на предмет предраковых состояний поджелудочной железы. Предраковые состояния поджелудочной железы представляют собой муцинозные кисты, диагностируемые с чувствительностью не более 80% с помощью современных цитопатологических молекулярных анализов (например, поиска ДНК с мутацией KRAS). Добавление одновременного обнаружения белков, связанных со злокачественной природой кист (например, MUC1 и CD55), считается необходимым для повышения точности диагностики. Предложенная в работе биоэлектронная матрица, основанная на технологии анализа отдельных молекул с использованием большого транзистора (SiMoT-технологии), позволяла анализировать как нуклеиновые кислоты, так и белки на уровне предела обнаружения отдельных молекул, показывая всего 1% ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Биомаркеры KRAS^{mut}, MUC1 и CD55 в плазме или жидкости кист одновременно обнаруживались мультисенсором с точностью до одной молекулы за 1,5 часа у 5-6 пациентов

[30]. Предраковые состояния поджелудочной железы были классифицированы с помощью машинного обучения, что обеспечило диагностическую чувствительность не менее 96% и диагностическую специфичность 100%. Это предварительное доклиническое исследование устройств на основе технологии SiMoT открыло путь к ранней диагностике предраковых состояний поджелудочной железы в плазме.

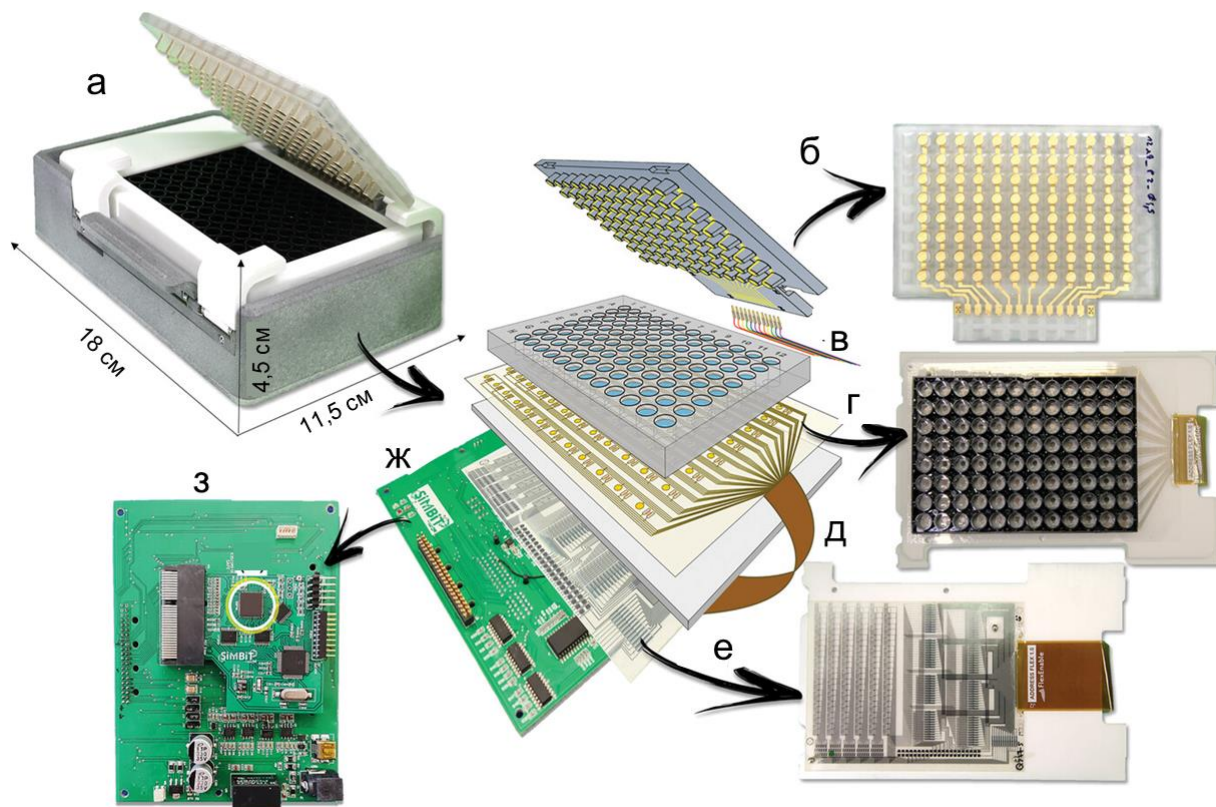


Рисунок 14 – (а) Изображение биоэлектронной платформы SiMBiT. Разобранная система, показанная справа, включает в себя, сверху вниз, следующие элементы: (б) 3D-печатный массив биофункционализированных сенсоров, покрывающих планшеты для ИФА, (в) пружинные штырьковые разъемы, (г) массив ОПТЭЗ на полиэтилен-2,6-нафталатной фольге, приклеенной к планшету для ИФА без дна, (д) плоский кабель, соединяющий массив биоэлектроники с (е) мультиплексной электроникой на основе однополярной технологии, (ж) печатную плату, интегрирующую (з) специализированный кремниевый чип [30].

Итак, суммируя рассмотренные в данном разделе публикации, можно сделать выводы о том, что в последние десятилетия именно органические полевые транзисторы с электролитическим затвором получили широкое применение в качестве селективных и высокочувствительных жидкостных биосенсоров, позволяющих обнаруживать и определять широкий спектр аналитов в сверхнизких концентрациях, вплоть до 1 молекулы аналита в 1 мкл раствора. Описано большое разнообразие как физических архитектур ОПТЭЗ, так и подходов к изготовлению биоузнающих слоев, включая разные типы узнающих элементов, иммобилизованных на поверхность ОПТЭЗ разными методами.

Тем не менее, несмотря на все достижения в области создания высокоэффективных ОПТЭЗ-биосенсоров, необходимы дополнительные исследования, которые позволят

преодолеть существующие на данный момент ограничения, прежде чем устройства смогут быть успешно интегрированы в реальную клиническую практику. Существует необходимость в углубленном понимании физических механизмов взаимосвязи структурных характеристик, электрических свойств и сенсорного отклика функциональных полупроводниковых и рецепторных материалов. По-прежнему нерешенными остаются проблемы долговременной стабильности ОПТЭЗ-устройств в условиях работы в реальных биологических жидкостях. Также сложной задачей остается разработка технологий массового производства и оптимизация технологических процессов для создания многоразовых и мультисенсорных чипов [10].

1.2. Использование полимерных материалов для изготовления биосенсоров разных типов

Данный раздел посвящен использованию полимерных материалов для изготовления биосенсоров разных типов. Как было показано в Разделе 1.1.2, сопряженные полимеры широко используются в качестве полупроводниковых слоев в биосенсорах на основе ОПТЭЗ и ОЭХТ, однако применение полимерных материалов в биосенсорике не ограничивается только этим. Для изготовления узнающих слоев в биосенсорах разных типов широко применяются молекулярно импринтированные полимеры (МИП), принцип действия которых аналогичен синтетическим рецепторам или антителам. Под молекулярным импринтингом понимают способ получения «молекулярных отпечатков», основанный на полимеризации функциональных мономеров в присутствии специально введенных целевых шаблонных молекул-темплатов. Такие полимеры перспективны для разработки высокопроизводительных, селективных и многоразовых систем скрининга различных аналитов в режиме реального времени.

Метод получения МИП состоит из трех этапов (Рисунок 15). На первом этапе мономер и молекулу-шаблон растворяют в подходящем растворителе для обеспечения предорганизации — образования устойчивого комплекса мономера и шаблона, благодаря которому молекулы мономера определенным образом координируются вокруг молекулы-шаблона. Затем проводят полимеризацию / поликонденсацию с большим избытком сшивающего агента, формируя сильно сшитый полимер с жесткой структурой. На третьем этапе молекулу-шаблон удаляют из полимерной сетки, в результате чего в полимере остаются поры, представляющие собой трехмерные отпечатки, которые специфически комплементарны целевым молекулам-шаблонам или близким к ним по структуре соединениям. При этом «отпечаток» соответствует шаблону не только по размеру и форме, но зачастую и по наличию

дополнительных функциональных групп, способных взаимодействовать с функциональными группами молекулы-шаблона.

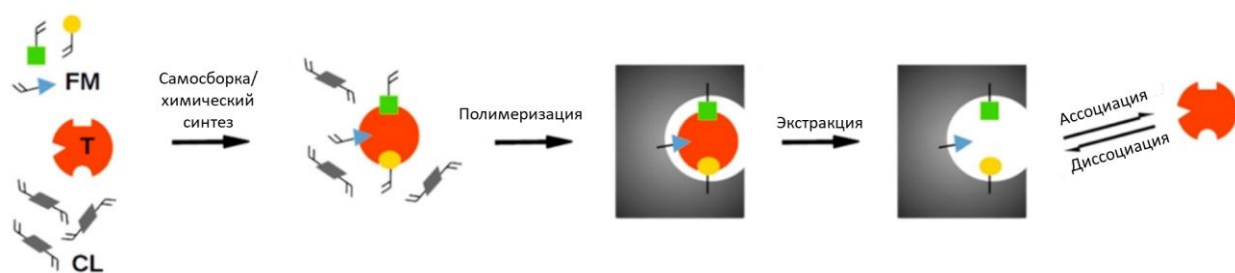


Рисунок 15 – Схема получения молекулярно-импринтированных полимеров

Для получения молекулярно импринтированных полимеров с варьируемой морфологией и размерами частиц (от микрочастиц до наноматериалов) применяют различные технологии синтеза, существенно влияющие на эффективность и функциональность сенсорных систем на основе МИП [59]. Одной из особенностей сенсоров на основе МИП является их универсальность благодаря возможности создать «молекулярный отпечаток» практически для любой молекулы-аналита. Эта адаптивность обусловлена возможностью изменения химической структуры, а, следовательно, и химических и физической свойств самих полимеров, тем самым повышая чувствительность, селективность, реакционную способность, гибкость и биосовместимость сенсоров на их основе [61]. Благодаря высокой адаптивности технологии открывается возможность создания более эффективных, быстрых, стабильных, компактных и биосовместимых устройств с меньшими затратами ресурсов, чем при использовании узнающих элементов на основе биомолекул: белков, антител и цельных клеток [62,63].

Так, Карасева с соавт. синтезировали молекулярно импринтированные частицы для обнаружения трипсина с использованием мини-эмульсионной полимеризации. Они оптимизировали влияние сшивающего агента и времени инкубации на свойства микрочастиц и получили частицы размером 200 нм с высокой связывающей способностью и селективностью. Далее использовали эти частицы в качестве узнающего элемента пьезоэлектрического сенсора для обнаружения трипсина, получив линейный отклик в диапазоне концентраций 0,125–2 мкг/мл с пределом обнаружения 0,07 мкг/мл. Также исследовали поведение разработанного пьезоэлектрического сенсора в реальных фармацевтических образцах [64].

Группой Ли был разработан электрохимический сенсор с использованием электрода из углеродной пасты и молекулярно импринтированных частиц для обнаружения метилпаратиона (рисунок 16). Они исследовали морфологию, площадь поверхности,

распределение размеров и адсорбционные свойства импринтированных микрочастиц, а затем использовали подготовленные транзисторы для создания сенсора. Также были охарактеризованы электрохимические свойства устройств. Сенсор, модифицированный импринтированными частицами и электродом из углеродной пасты, показал высокую чувствительность к метилпаратиону. Диапазон определяемых концентраций составил от 8×10^{-9} до 1×10^{-12} моль/л, а нижний предел — всего $3,4 \times 10^{-13}$ моль/л. Сенсор также использовали для определения метилпаратиона в образцах почвы и овощей с помощью простой предварительной обработки [65].



Рисунок 16 – Схема изготовления электрода из поверхностных молекулярно импринтированных полимерных микросфер и углеродной пасты

Гуи с соавт. создали мезопористые молекулярно импринтированные флуоресцентные частицы с двойной эмиссией для обнаружения малахитового зеленого. Они модифицировали флуоресцентный сенсор, разместив зеленые флуоресцентные квантовые точки в ядре частиц диоксида кремния и красные флуоресцентные точки вокруг молекулярно импринтированных пор. При добавлении малахитового зеленого цвет сенсора менялся с оранжевого на зеленый из-за подавления фотолюминесценции красных точек. Сенсор имел линейную зависимость в широком диапазоне концентраций (от 27,4 нМ до 137 нМ) с пределом обнаружения 17,0 нМ. Также был успешно определен малахитовый зеленый в пробах речной и озерной воды [66].

В целом область применения молекулярно-импринтированных полимеров достаточно обширна и включает в себя распознавание химических, биохимических, биологических и биомедицинских аналитов благодаря высокой селективности МИП, их длительной

стабильности при нормальных условиях, устойчивости к давлению, высоким температурам и экстремальным значениям pH. Ион-импринтированные полимеры были успешно использованы для определения ионов тяжелых металлов [67]. С использованием МИП были распознаны малые молекулы, такие как кофеин [68], теофиллин [69], гистамин [70], мочевиная кислота [71], ферменты [72], белки [73] и целые клетки [74]. Во время пандемии, вызванной коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2, научной группой Сирицкого [75] был разработан портативный электрохимический датчик на основе молекулярно-импринтированных полимеров для обнаружения нуклеопротеина SARS-CoV-2 (рисунок 17).

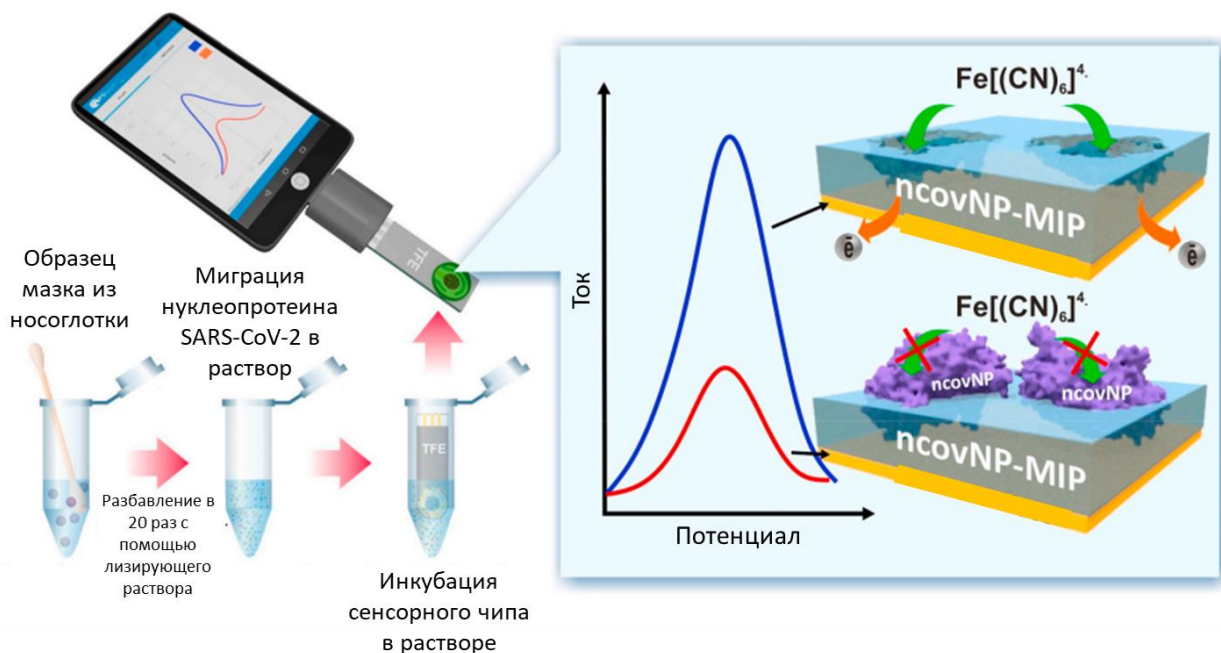


Рисунок 17 – Принцип диагностики COVID-19 с помощью сенсора на нуклеопротеин SARS-CoV-2 nconNP, анализирующего образцы, полученные из мазков из носоглотки пациентов

Помимо молекулярно-импринтированных полимеров при разработке сенсоров-медиаторов и биосенсоров широко применяют полимеры, обладающие окислительно-восстановительными группами, которые способны обратимо окисляться и восстанавливаться. Такие полимеры часто используют для иммобилизации оксидоредуктаз, обеспечивая лучшую стабильность биосенсоров и безметочный подход к обнаружению аналита. Эффективный перенос электронов между окислительно-восстановительным центром фермента и поверхностью электрода, обеспечиваемый такими полимерами, улучшает работу биосенсоров [76,77] и ферментативных биотопливных элементов [78]. Для иммобилизации бактерий и регистрации их биохимического потребления кислорода были использованы биосовместимые активные сополимеры на основе бычьего сывороточного альбумина и хитозана с ковалентно связанными окислительно-восстановительными медиаторами, содержащие углеродные нанотрубки [79]. Для разработки ферментативных биосенсоров с широким линейным диапазоном, улучшенной стабильностью и высокой устойчивостью к помехам от

электрохимически активных веществ, присутствующих в реальных образцах биологических жидкостей были применены полимеры и композиты на их основе с различными наночастицами золота [80].

Функционализированные аптамером нанокластеры серебра (ДНК-AgNCs) в сочетании с наночастицами полипиррола (PPyNPs) были использованы для разработки флуоресцентного аптасенсора для обнаружения стафилококкового энтеротоксина А [81]. Флуоресцентные AgNCs, синтезированные с использованием аптамеров в качестве молекул-шаблонов, применяли в качестве флуоресцентных зондов, флуоресценция которых подавлялась PPyNPs. В присутствии целевого стафилококкового энтеротоксина А модифицированные аптамером AgNCs десорбировались с поверхности PPyNPs за счет связывания стафилококкового энтеротоксина А с нанокластером серебра AgNCs, что приводило к восстановлению флуоресценции. В оптимизированных условиях относительная интенсивность флуоресценции демонстрировала линейную зависимость от концентрации стафилококкового энтеротоксина А в диапазоне от 0,5 до 1000 нг/мл с пределом обнаружения 0,3393 нг/мл. Сенсор был успешно использован для оценки содержания стафилококкового энтеротоксина А в образцах молока, а эффективность восстановления флуоресценции составляла от 87,70% до 94,65%. Таким образом, сенсор показал большой потенциал для применения в анализе пищевых продуктов. Предложенная платформа представляет собой флуоресцентный сенсор на основе аптамеров, который может быть использован для сверхчувствительного обнаружения различных токсинов благодаря высокой аффинности и специфичности соответствующих аптамеров.

Сопряженные полимеры и сополимеры выделяются среди других полимеров своей экологической безопасностью, гибкостью и привлекательными электрохимическими и электрохромными свойствами [82-84], благодаря чему предлагают множество технологических решений, важных для разработки датчиков и биосенсоров [85]. Так, биосовместимые сопряженные полимеры полианилин и полипиррол были успешно использованы в качестве матрицы для захвата или иммобилизации биомолекул (ферментов, антигенов, антител, клеток) [86]. Разработанный биосенсор характеризовался линейной зависимостью аналитического сигнала от концентрации глюкозы в диапазоне от 0,1 до 0,70 ммоль/л, чувствительностью $4,31 \text{ мА} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, пределом обнаружения 0,10 ммоль/л и периодом полураспада 19 дней.

Для ранней диагностики онкозаболеваний был разработан иммуносенсор на основе проводящего полимера полипиррола [87], позволивший продемонстрировать новый подход к обнаружению биомаркеров рака. Схема электрохимического синтеза сопряженного полимера, модифицированного антителами, для определения нового простат-специфического биомаркера рака (CCR4) представлена на рисунке 18 [88].

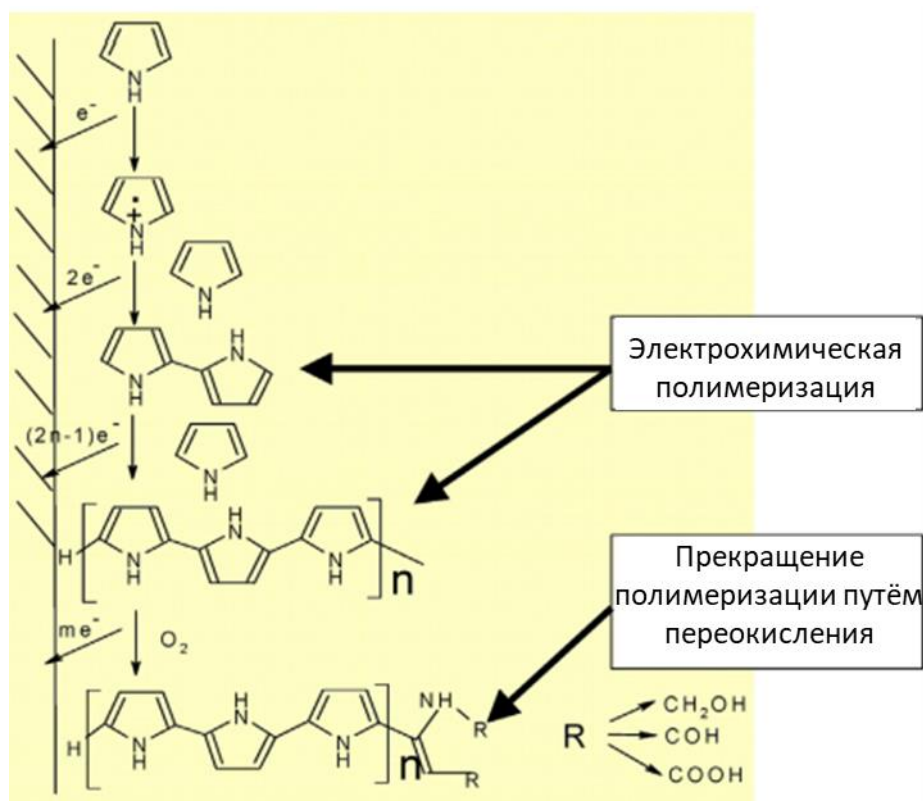


Рисунок 18 – Схема электрохимического синтеза полипиррола

Импедансный иммуносенсор был создан путем модификации листа оксида индия-олова (ITO) сопряженным пиррольным полимером P(Pyr-Pac) и последующей иммобилизации антител к рецептору хемокина CC4 (CCR4). Полипиррол P(Pyr-Pac) с кислотными заместителями содержал множество карбоксильных групп, что обеспечило возможность для присоединения антител к CCR4. Этапы изготовления сенсора контролировали методами спектроскопии электрохимического импеданса и циклической вольтамперометрии, при этом спектроскопия импеданса использовалась для определения концентрации CCR4. Биосенсорная поверхность с прикрепленными антителами к CCR4 обладала высокой селективностью к антигену CCR4, а специфическое взаимодействие обеспечивало изменения электрохимического сигнала. Были проведены исследования по оптимизации, включающие количество полимера, концентрацию антител к CCR4, время иммобилизации антител к CCR4 и время взаимодействия антител к CCR4 с антигеном CCR4. Разработанный иммуносенсор продемонстрировал линейный отклик на увеличение концентрации антигена CCR4 в диапазоне концентраций 0,02–8 пг/мл и низкий предел обнаружения, равный 6,4 фг/мл. Кроме того, биосенсор обладал высокой воспроизводимостью и был успешно использован для количественного определения антигена CCR4 в образцах сыворотки крови. Степень извлечения для образцов сыворотки с добавлением антигена составляла от 98,25% до 103,99%.

Предложенный иммуносенсор продемонстрировал хорошую селективность по отношению к некоторым интерферентам, включая различные биомаркеры.

На основе проводящих полимеров были разработаны безметочные, чувствительные и одноразовые иммуносенсоры для идентификации биомаркеров рака молочной железы [89] и обнаружения раковых и метастатических клеток, успешно отличающие их от нормальных клеток. Был разработан сверхчувствительный безметочный электрохимический ДНК-сенсор на основе платформы «проводящий полимер/восстановленный оксид графена» для обнаружения гена BRCA1. В качестве простого и контролируемого метода был применен электрохимический метод восстановления оксида графена, а также электрополимеризация мономера пиррол-3-карбоновой кислоты. Результаты данной работы показали, что сопряженный полимер, покрытый восстановленным оксидом графена, обеспечивает больше активных участков для иммобилизации ДНК-зонда по сравнению с полимером, покрытым стеклоуглеродным электродом. Для мониторинга электрохимического поведения окислительно-восстановительного зонда созданного сенсора использовали методы циклической вольтамперометрии, дифференциальной импульсной вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса. Для изучения морфологических особенностей и характеристик поверхностных структур применяли атомно-силовую и сканирующую электронную микроскопию. Изготовленный биосенсор позволил количественно определить BRCA1 в диапазоне 10 фМ – 0,1 мкМ с пределом обнаружения всего 3 фМ и продемонстрировал отличную способность различать комплементарные, некомплементарные и несовпадающие последовательности ДНК. Также сенсор был успешно использован для точного определения следовых количеств целевой ДНК в образцах плазмы крови.

Полимерные точки, допированные MnO_2 , были применены при разработке беспроводного безметочного электрохимического сенсора для обнаружения раковых клеток (рисунок 19) [90]. Примененные в работе электропроводящие полимерные точки демонстрировали сильное флуоресцентное излучение, которое подавлялось при нанесении их на MnO_2 , что снижало сопротивление биосенсора. В присутствии внеклеточной щелочной фосфатазы, экспрессируемой раковыми клетками, и после добавления 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты комплекс ПТ/ MnO_2 демонстрировал расщепление MnO_2 из-за образования аскорбиновой кислоты в результате гидролиза 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты под действием щелочной фосфатазы. Это явление вызывало восстановление флуоресценции полимерных точек и изменение сопротивления биосенсора, что было использовано в качестве сенсорного отклика для обнаружения раковых клеток. Предел обнаружения разработанного биосенсора, использующего электрохимический подход, составил 3,98 клеток/мл, тогда как у биосенсора, использующего флуоресцентный подход, он составил 1995 клеток/мл. Кроме

того, электрохимические сигналы могут быть собраны беспроводным электронным устройством, что позволяет проводить обнаружение рака в режиме реального времени непосредственно с помощью смартфона.

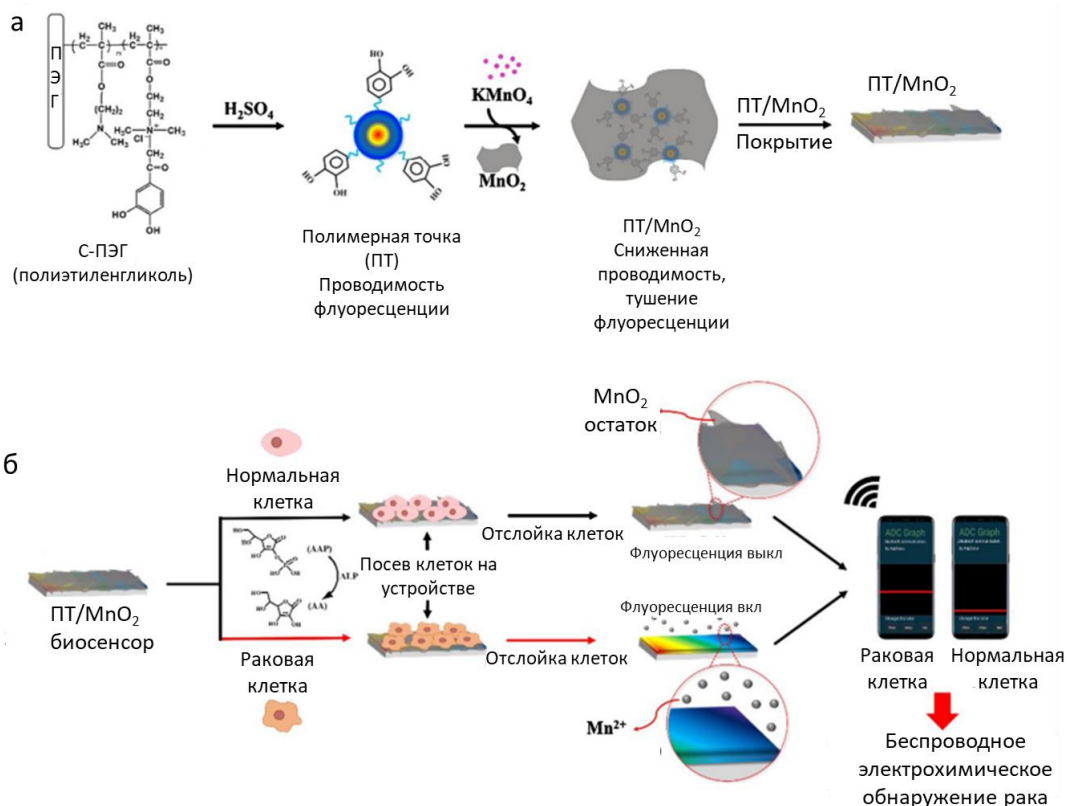


Рисунок 19 – Схема беспроводного обнаружения рака с помощью ПТ/ MnO_2 . а) Изготовление биосенсора ПТ/ MnO_2 . б) Предложенные механизмы обнаружения рака с помощью биосенсоров ПТ/ MnO_2

В работе [91] было показано, что клетки рака молочной железы человека MCF-7 могут быть обнаружены с помощью нанокompозита, состоящего из полимера и многослойных нанотрубок, в биосенсоре сэндвич-типа на основе двойного аптамера. Биосовместимый нанокompозит, состоящий из многослойных углеродных нанотрубок и полиглутаминовой кислоты, помещали на стеклоглеродный электрод. Сэндвич-анализ был основан на использовании аптамера, связывающего муцин-1, который сначала иммобилизовали на поверхности модифицированного стеклоглеродного электрода. Другой аптамер (меченый наночастицами серебра) применяли для вторичного распознавания клеток MCF-7 с целью повышения селективности и получения усиленного сигнала. Для отслеживания электрохимического сигнала наночастиц серебра использовали дифференциальную импульсную анодную вольтамперометрию. В оптимальных условиях сенсор реагировал на клетки MCF-7 в диапазоне концентраций от $1,0 \times 10^2$ до $1,0 \times 10^7$ клеток·мл⁻¹ с пределом обнаружения 25 клеток. Авторы также показали, что данный биосенсор может обнаруживать

опухолевый маркер муцин-1. Анализ обладал высокой селективностью и чувствительностью, приемлемой стабильностью и воспроизводимостью.

Суммируя рассмотренные публикации, можно сделать вывод о том, что молекулярно импринтированные, электрохимически активные и сопряженные полимеры широко используются в высокочувствительных селективных биосенсорах в качестве полупроводниковых, рецепторных и узнающих слоев, однако в доступной литературе не было обнаружено примеров использования тех или иных полимерных соединений в качестве рецепторных слоев в составе ОПТЭЗ.

1.3. Использование ДНК-аптамеров для изготовления биосенсоров с различными механизмами обнаружения аналита

Следует отметить, что не только конструкция сенсорного устройства на основе ОПТЭЗ, но и выбор узнающих элементов также играет решающую роль для дальнейшего прогресса, поскольку в настоящее время ОПТЭЗ-сенсоры часто не имеют практического применения из-за их низкой стабильности, медленного отклика или высокого отношения сигнал/шум. Разнообразие узнающих элементов для ОПТЭЗ велико – белки, ферменты, антитела, целые клетки и аптамеры. Как было детально рассмотрено в Разделе 1.1, одним из перспективных вариантов узнающих элементов для ОПТЭЗ-биосенсоров являются ДНК-аптамеры. Аптамеры - это короткие одноцепочечные олигонуклеотидные последовательности (на основе ДНК или РНК), обладающие способностью к специфическому и высокоаффинному связыванию с мишенями, а также 3D-структурной стабильностью благодаря присущей им способности к самосборке [92]. Они обладают значительными преимуществами по сравнению с другими элементами узнавания, поскольку могут быть химически синтезированы практически с любыми желаемыми модификациями, устойчивы к воздействию тепла и изменению pH благодаря обратимой денатурации, что делает их более эффективными для практического применения [93]. Преимуществом использования аптамеров является возможность подбора аптамера с высокой специфичностью к взаимодействию с широким спектром токсинов и патогенов, начиная от вирусов и бактерий и заканчивая ионами тяжелых металлов и другими низкомолекулярными соединениями. Кроме того, аптамеры не подвержены денатурации, не требуют особых условий хранения и могут быть наработаны в большом количестве за короткое время с использованием процедуры отбора аптамеров из библиотек олигонуклеотидов случайных последовательностей (SELEX - Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), что выгодно отличает их от антител, также широко используемых в качестве узнающих элементов.

На рисунке 20 показаны различные варианты структур аптамеров, которые могут связываться со многими мишенями, такими как белки, токсины, вирусы и витамины [106]. Эти аптамеры были изучены на предмет их применения в диагностических и терапевтических целях, было показано, что круг потенциальных мишеней исключительно широк [107].

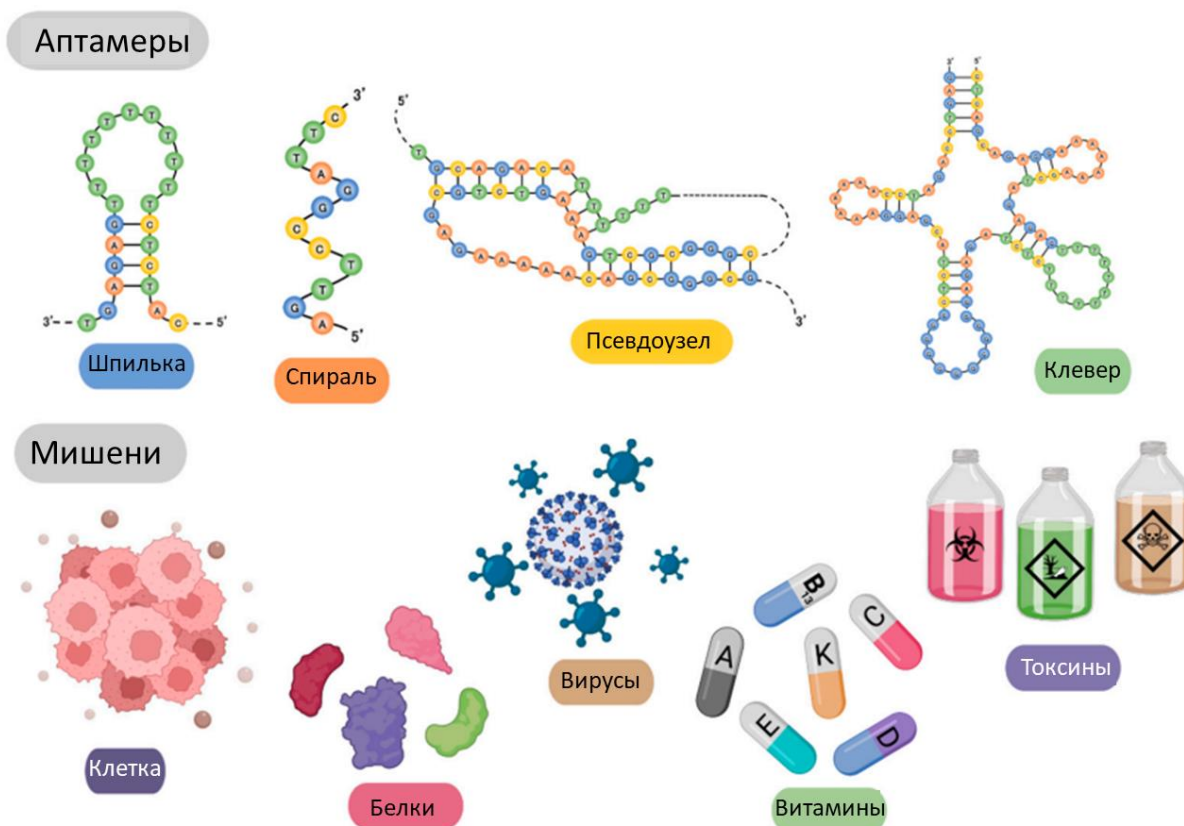


Рисунок 20 – Варианты структур и мишеней аптамеров

Благодаря высокой аффинности, присущей аптамерам по отношению к целевым белкам, а также их другим физико-химическим свойствам аптамеры используются в качестве элемента узнавания в биосенсорах в качестве альтернативы антителам [108]. По сравнению с антителами аптамеры обладают многими преимуществами, они химически и структурно стабильны. В то время как антитела легко подвергаются необратимой денатурации, аптамеры могут восстанавливать свою нативную конформацию путем изменения условий, таких как изменение pH среды (незначительные изменения), концентрация соли, хелатирующие агенты и температура. Аптамеры не повреждаются во многих из этих условий, за исключением экстремальных значений pH, при которых структура аптамера может быть необратимо нарушена. Кроме того, производство моноклональных антител является трудоемким и очень дорогостоящим процессом, в то время как аптамеры могут быть синтезированы в большом количестве, с большей точностью и воспроизводимостью, а также по относительно более низкой цене. В дополнение к этому, аптамеры могут быть химически модифицированы или конъюгированы без потери их связывающей способности, тогда как антитела требуют

стохастических модификаций, которые могут привести к потере связывающей активности [109]. Аптамеры могут храниться в течение длительного времени без потери своей активности из-за термической денатурации [110]. Наконец, аптамеры обладают низкой или нулевой токсичностью и иммуногенностью, что имеет решающее значение для применения *in vitro* и *in vivo* [111].

Аптамеры являются хорошими кандидатами для узнающих элементов биосенсоров, использующих оптические, электрохимические и масс-спектрометрические методы обнаружения. При этом существуют исследования, которые показывают, что некоторые аптамеры не способны связываться с целевой молекулой [112]. Например, Цзун и Лю показали, что в структуре аптамера, связывающего мышьяк(III), не было специфического связывания, несмотря на то, что эта структура была использована и описана в двух десятках рецензируемых статей ранее [113]. Для более глубокого понимания структур аптамер-мишень были предложены новые аналитические методы, исследующие кинетические и термодинамические параметры события связывания, а также структуру аптамера и комплекса аптамер-мишень. В части кинетических и термодинамических параметров аналитические методы разделены на две группы: методы, в которых взаимодействия изучаются в растворе, и методы, в которых кинетика взаимодействия аптамера с мишенью характеризуется при иммобилизации одной из связывающих структур на тот или иной субстрат. В настоящее время протоколы иммобилизации аптамеров применяются при разработке электрохимических, масс-чувствительных или оптических аптасенсоров. Методы исследования структур аптамера и комплекса аптамер-мишень также подразделяется на два типа: методы высокого разрешения, такие как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рентгеновская кристаллография и электронная микроскопия (ЭМ), и методы низкого разрешения. К методам низкого разрешения, которые могут предоставить информацию о размере и форме аптамера, относятся малоугловое рентгеновское рассеяние и спектроскопия кругового дихроизма [112].

В литературе описаны различные подходы к обнаружению вирусов с помощью аптасенсоров: колориметрический метод, флуоресцентный анализ, поверхностный плазмонный резонанс, поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия, электрохимическое определение и использование различных полевых транзисторов.

Колориметрическое обнаружение связано с измерением изменения цвета путем прямого наблюдения невооруженным глазом или с помощью спектрофотометра для оценки концентрации целевых веществ, обеспечивая простоту выполнения без использования дорогостоящих приборов [114,115]. В колориметрическом сенсоре с использованием наноматериалов используют их оптические свойства для формирования сенсорного отклика, при этом наночастицы в растворе адсорбируют аптамерами для предотвращения их агрегации.

Затем, при добавлении целевого анализита благодаря специфическому взаимодействию аптамера и анализита наночастицы агрегируют и вызывают изменение цвета раствора. Принцип работы типичного аптасенсора с использованием наноматериалов показан на рисунке 21а, сверху. Золотые наночастицы (AuNP) используются чаще всего благодаря своим уникальным оптическим свойствам [116]. Ферментативно-опосредованный колориметрический аптасенсор обычно имеет «сэндвич»-подобную форму «аптамер 1-мишень-аптамер 2». Меченый ферментом аптамер 2 катализирует хромогенный реагент, вызывая изменение цвета и обеспечивая обнаружение мишени (рисунок 21а, внизу).

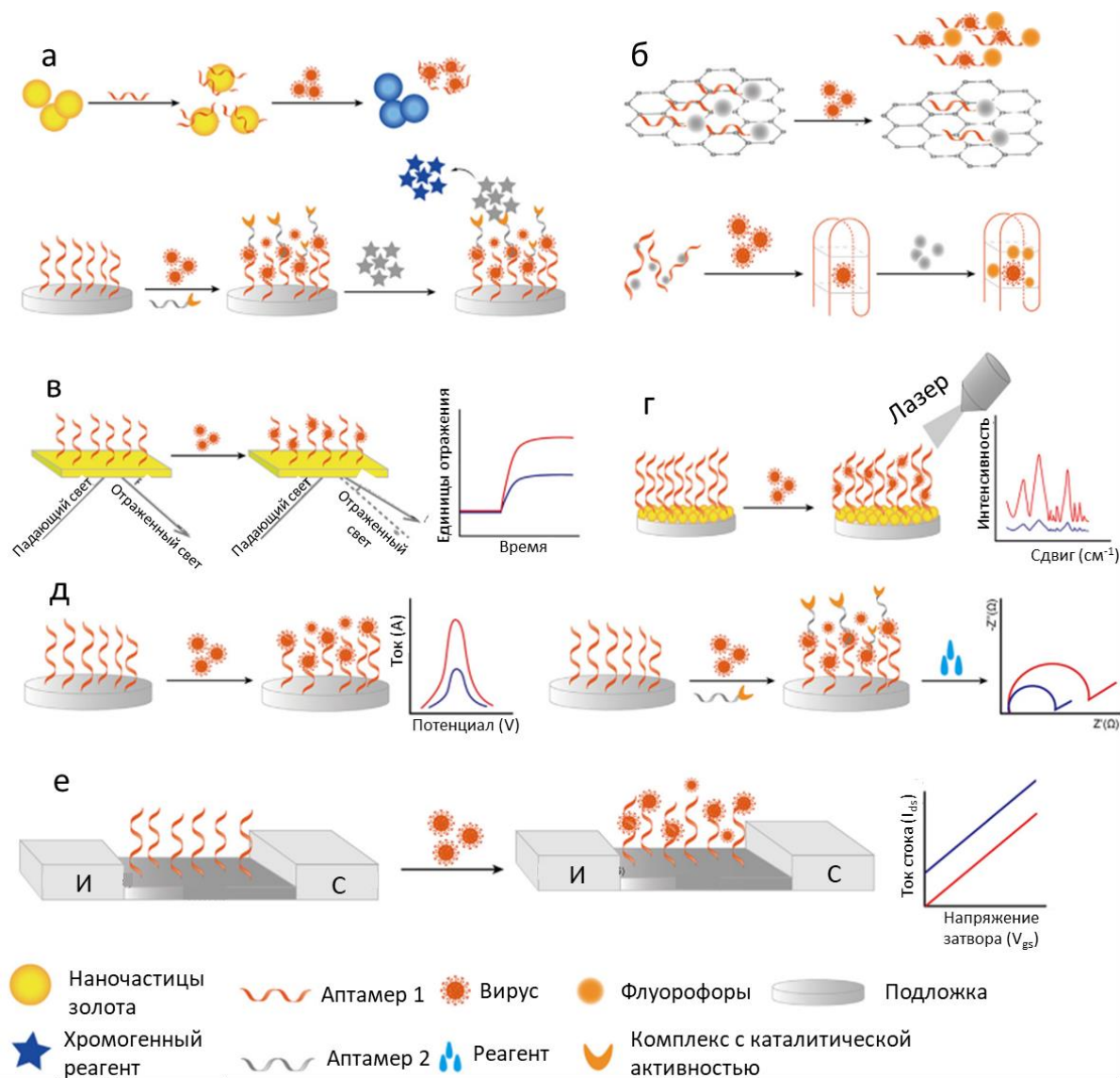


Рисунок 21 – (а) Принципы работы типичных колориметрических аптасенсоров, включая колориметрические анализы с использованием наноматериалов (сверху) и ферментов (снизу); (б) принципы работы типичных меченых (сверху) и немеченых (снизу) флуоресцентных аптасенсоров; (в) принцип работы типичных аптасенсоров на основе поверхностного плазмонного резонанса; (г) принцип работы типичных аптасенсоров на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света; (д) принципы работы типичных электрохимических аптасенсоров без фермента (слева) и с ферментом (справа); (е) принцип работы типичных аптасенсоров на основе полевых транзисторов

Так, Бассо с соавт. [117] использовали гибридный наноматериал, образованный путем связывания магнитных наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ с модифицированными аптамерами золотыми наночастицами на поверхности, для разработки нового колориметрического аптасенсора на вирус лихорадки Денге. При связывании аптамеров с вирусом покрытие из золотых наночастиц увеличивалось, а площадь поверхности уменьшалась, что приводило к изменению цвета. В архитектуре сенсора использовали аптамеры вместо традиционных антител, что позволило исключить интерференцию других подобных вирусов (таких как вирус Зика, вирус желтой лихорадки и т. д.) и обеспечило специфическое связывание с вирусом Денге.

Флуоресцентные аптасенсоры делятся на меченые и немеченые в зависимости от того, помечен ли аптамер флуорофором [118]. В меченом аптасенсоре аптамеры, помеченные флуорофором, действуют как захватывающие нанозонды. Они могут адсорбироваться на поверхностях (таких как графен, оксиды и сульфиды переходных металлов и т. д.), что приводит к тушению флуоресценции. Затем, при добавлении вируса достигается восстановление флуоресценции благодаря взаимодействию аптамера и вируса. Принцип работы типичных меченых флуоресцентных аптасенсоров показан на рисунке 21б. Так, Су и соавторы [119] сообщили об аптасенсоре на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии, который позволяет проводить одноэтапное количественное обнаружение вируса гепатита Б. Однако процесс мечения является трудоемким, сложным и занимает много времени, поэтому в последние годы все больше внимания привлекают аптасенсоры без меток. В таком аптасенсоре в качестве индикатора выступает свободный флуоресцентный агент. В отсутствие целевых молекул флуоресцентный сигнал практически отсутствует, тогда как при добавлении целевого аналита между аптамером и аналитом образуется стабильный G-квадруплексный комплекс, который связывает флуоресцентный агент и возбуждает флуоресцентное излучение.

Сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR – surface plasmon resonance) — это оптическое сенсорное устройство, использующее чувствительность поверхностного плазмона, особого типа электромагнитного поля, для измерения изменения показателя преломления [120]. В типичном аптасенсоре на основе поверхностного плазмонного резонанса аптамеры обычно иммобилизованы на золотом слое в качестве узнающих зондов [121]. При прочих равных условиях изменение угла SPR зависит от взаимодействия аптамеров и целевых аналитов [122]. Принцип работы типичного аптасенсора на основе SPR показан на рисунке 21в. Следует отметить, что традиционные сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса имеют ограничения в селективности и чувствительности по сравнению с мечеными флуоресцентными аптасенсорами.

В типичном аптасенсоре на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) молекулы-репортеры, модифицированные аптамерами, обычно иммобилизуются на наноструктурированной металло-диэлектрической подложке для распознавания и захвата вирусов. Интенсивность рассеяния изменяется при взаимодействии аптамеров и вирусов, что позволяет обнаруживать и количественно определять целевые вирусы-аналиты. Принцип работы такого аптасенсора показан на рисунке 21г. С тех пор как аптамеры были впервые применены в спектроскопии ГКР Халасом, Москovicем и их коллегами [121], опубликовано много работ по аптасенсорам на основе ГКР [123,124]. Негри и др. [125] впервые предложили безметочную платформу на основе спектроскопии ГКР для обнаружения нуклеопротеинов вируса гриппа. В этой платформе в качестве активных подложек были использованы наностержни серебра, на которые были иммобилизованы поливалентные аптамеры. Сигнал отклика получали путем сравнения спектров ГКР аптамера и комплекса аптамер-нуклеопротеин. Однако этот метод имел ряд недостатков, связанных с низкой воспроизводимостью.

Электрохимические аптасенсоры оценивают концентрацию интересующих целевых веществ путем измерения изменения тока или электрического сопротивления в результате происходящей окислительно-восстановительной реакции между целевым аналитом и аптамерами, закрепленными на поверхности электрода сенсора [126]. Электрохимические аптасенсоры подразделяют на три типа: аптасенсоры с ферментами, аптасенсоры без ферментов и аптасенсоры на основе полевых транзисторов [127]. В аптасенсоре без ферментов захватывающие зонды иммобилизованы на электродах, а взаимодействие аптамеров и целевых веществ приводит непосредственно к изменениям электрического сигнала. В аптасенсоре с ферментами для генерации сигнала необходимо использование ферментов. Принципы работы типичных электрохимических аптасенсоров без ферментов и с ферментами показаны на рисунке 21д.

В аптасенсорах на основе полевых транзисторов аптамеры иммобилизованы на поверхности полупроводникового слоя или электрода затвора. Напряжение электрода затвора регулирует величину тока стока, а связывание аптамеров и целевых молекул на затворном электроде приводит к изменению тока стока, тогда как связывание аптамеров и целевых молекул на поверхности полупроводника — к изменению порогового напряжения или передаточной проводимости. Принцип работы типичного аптасенсора на основе полевого транзистора показан на рис. 21е. Аптасенсоры на основе полевых транзисторов обладают превосходными характеристиками, включая сверхвысокую чувствительность, простоту измерения, портативность, низкую стоимость, высокую скорость анализа и т. д. [128].

Так, группа Ванга [129] продемонстрировала функционализированный аптамером монослой графена в качестве проводящего канала полевого транзистора для обнаружения фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α , биомаркера воспалительного цитокина (рисунок 22а). На первом этапе функционализации графена сукцинимидиловый эфир 1-пиренбутановой кислоты (СЭПК) был иммобилизован на монослой графена посредством π - π -стэкинга в качестве линкера для функционализации аптамера. Затем фосфатированный аптамер был ковалентно связан с молекулой СЭПК, что привело к иммобилизации аптамера на поверхности графена. Наконец, графен был обработан полисорбатом 20 и этаноламином для пассивации непокрытой области графена и гашения непрореагировавших молекул СЭПК. По мере увеличения концентрации молекул фактора некроза опухоли напряжение Дирака транзистора уменьшалось, что указывает на легирование n-типа, вызванное специфическим связыванием аптамера с TNF- α (рисунок 22б). Предел обнаружения для фактора некроза опухоли-альфа составил 5 пМ. Биосенсор показал высокую селективность к двум другим воспалительным цитокинам, а именно к интерферону-гамма (IFN- γ) и интерлейкину-002 (IL-002), а также к бычьему сывороточному альбумину (BSA) (рисунок 22в). Благодаря низкому пределу обнаружения и высокой селективности, этот сенсор потенциально может быть применен для исследования образцов сыворотки. Необходим дальнейший анализ для изучения механизма детектирования, возможные варианты связаны с индуцированием заряда от TNF- α к графену или конформационным изменением аптамера, вызванным связыванием. [130].

Было предпринято несколько попыток повысить чувствительность и селективность ОПТ-биосенсоров для обнаружения цитокиновых биомаркеров за счет функционализации аптамерами. Группа Хванга предложила гибкий биосенсор на основе полевого транзистора, модифицированного графеном, для обнаружения белка интерлейкина-6 (IL-6) с чувствительностью уровня аМ (рисунок 22г, д) [131]. Чрезвычайно низкий предел обнаружения авторы объяснили двумя эффектами изгиба графена: (1) увеличением длины экранирования Дебая, что уменьшает экранирование заряда биомолекул, и (2) открытием запрещенной зоны, что позволяет получить экспоненциальный отклик тока на небольшое число зарядов [131]. Поскольку чувствительность сенсора контролировалась степенью изгиба, широкий диапазон целевых концентраций может быть охвачен путем создания нескольких сенсоров с различными степенями изгиба. Равномерный контроль степени изгиба может повысить надежность биосенсорного анализа. Группа Хао исследовала модуляцию плотности молекул СЭПК, которые иммобилизуют на себя аптамер, путем настройки электрического поля для повышения чувствительности обнаружения (рисунок 22е) [132]. Применение электрического поля равного $-0,3$ В в течение 3 часов в процессе иммобилизации СЭПК увеличило плотность иммобилизации СЭПК и аптамера, что подтверждено электрическими

измерениями сдвига напряжения Дирака (рисунок 22ж) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией для количественного определения фосфора, обнаруженного в образце (рисунок 22з). С помощью метода электрического поля предел обнаружения для биомаркера интерлейкина-6 был снижен с 1,66 пМ до 618 фМ.

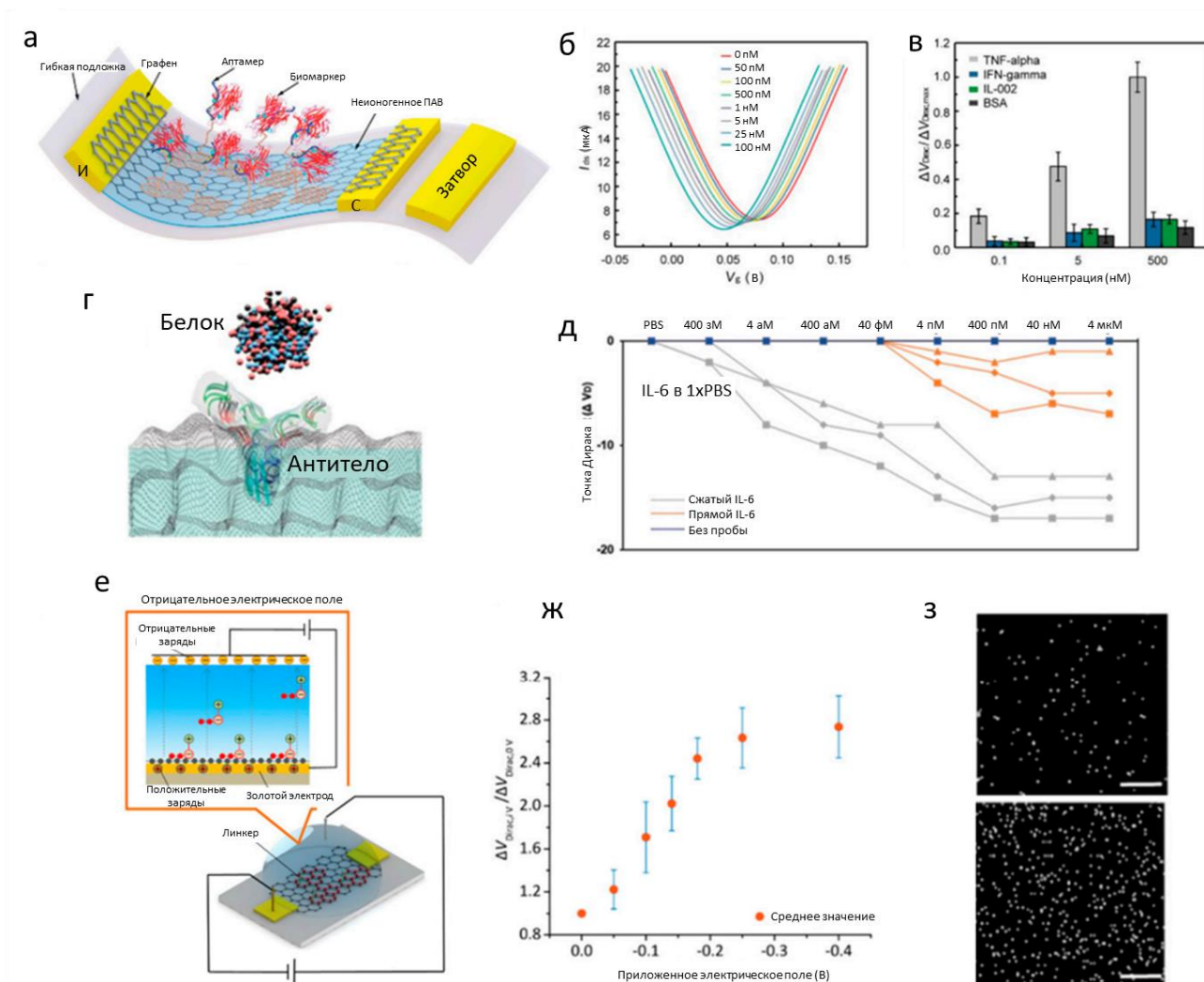


Рисунок 22– (а) Схема биосенсора на основе функционализированного аптамером графенового полевого транзистора; (б) передаточные характеристики, измеренные при воздействии на биосенсор раствора TNF- α различной концентрации; (в) нормализованное изменение напряжения Дирака для целевого и контрольных аналитов; (г) схема захвата белков специфическими антителами на канале из сжатого графена; (д) сдвиг напряжения Дирака ОПТ-сенсора при обнаружении белка IL-6; (е) Диаграмма иммобилизации СЭПК с применением отрицательного электрического поля; (ж) сдвиг точки Дирака показан как функция приложенного электрического поля; (з) результаты энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии поверхностей графена без (сверху) и с (снизу) приложением электрического поля в процессе иммобилизации СЭПК и аптамера

Следует отметить, что сочетание ОПТЭЗ в качестве электронной основы с аптамерами в качестве узнающих элементов в одном биосенсоре позволяет осуществлять мультиплексирование (т.е., одновременное определение набора специфических биомаркеров в одном и том же образце). По аналогии с «электронным носом» такой подход позволяет

создавать жидкостные биосенсоры для многопараметрического определения аналитов путем модификации устройства или его компонентов различными узнающими элементами, сбора различных параметров ОПТЭЗ в качестве сенсорного отклика или построения модели распознавания с одним узнающим элементом, чувствительным к нескольким аналитам одновременно. Многоцелевое обнаружение на одном чипе критически важно в случае имплантируемых биосенсоров, например, для раннего обнаружения маркеров воспаления после имплантации сустава, когда необходимо одновременное определение pH и интерлейкина в качестве необходимого и достаточного доказательства начала воспалительного процесса непосредственно в месте операции.

Аптамеры являются перспективными узнающими элементами для построения модели распознавания с одним узнающим элементом, чувствительным к нескольким аналитам одновременно благодаря своей способности изменять конформацию под влиянием внешних факторов, например, изменения pH. Так, ДНК-аптамер со структурой i-мотив представляет собой неканоническую структуру, которая образуется из обогащенных цитозином последовательностей при слабокислом pH (обычно pH 5-6). Аптамер состоит из фрагментов i-мотива и двойной спирали; интерфейс между этими фрагментами обладает способностью к специфическому и высокоаффинному распознаванию гемагглютиниона, поверхностного белка вируса гриппа А [133,134], связывание которого оптимально при pH 6 (свернутый i-мотив) и почти на два порядка хуже при pH 8 (развернутый i-мотив). Развернутый фрагмент i-мотива способен к связыванию ионов серебра, которое сопровождается образованием неканонического дуплекса, стабилизированного парами оснований цитозин:Ag⁺:цитозин [135]. Предполагается, что i-мотивы играют роль регуляторных элементов в геноме, но конкретные механизмы известны лишь на нескольких примерах [136-138]. pH-зависимая сборка структуры i-мотива была использована при разработке pH-чувствительных элементов ДНК для биоаналитических и медицинских целей. Такие структуры демонстрировали pH-зависимые конформационные переходы фрагмента i-мотив, высвобождая лекарственное средство при изменении pH среды [139-141] или открывая узнающий элемент в кислой макро- или микросреде [142-144]. Более того, аптамер i-мотив был использован в электрохимических сенсорах для мониторинга изменений pH во время ферментативных реакций [145] или для определения pH в капле биологической жидкости [146].

Таким образом, благодаря совокупности своих физико-химических свойств, совмещенных с высокой стабильностью в биологических средах и относительной простотой синтеза, а также возможностью создания структур, высокоаффинных к широкому кругу аналитов, аптамеры зарекомендовали себя в качестве эффективных узнающих элементов на широкий круг токсинов и патогенов для применения в совершенно разных типах и

архитектурах биосенсорных систем, основанных на различных принципах обнаружения аналитов. Сочетание аптамеров с различными архитектурами ОПТЭЗ является новым и перспективным подходом к созданию высокочувствительных биосенсоров, способных к обнаружению целевых аналитов в т.ч. в реальных биологических жидкостях. Использование аптамера i-мотив в качестве узнающего элемента в составе ОПТЭЗ потенциально перспективно для подтверждения гипотезы о возможности создания мультисенсорных устройств на основе ОПТЭЗ.

1.4. Использование «клик»-реакций для биофункционализации поверхности органических полевых транзисторов с электролитическим затвором

Данный раздел литобзора посвящен рассмотрению публикаций, описывающих «клик»-реакции и их применение для биофункционализации поверхностей, в т.ч. поверхностей сенсорных устройств.

1,3-диполярное азид-алкильное циклоприсоединение, катализируемое одновалентной медью, представляет собой наиболее яркий модельный пример реакций, которые впоследствии стали называть «клик»-реакциями за быстроту протекания и отсутствие побочных продуктов. Традиционный способ проведения этой реакции при повышенных температурах представляет собой медленный процесс, приводящий к смеси двух триазолов. Региоспецифичность реакции азид-алкильного циклоприсоединения была достигнута в работах Шарплесса [147] и Мелдала [148], проведенных в одно время независимо друг от друга. Ими было показано, что взаимодействие азидной группы с алкинами существенно улучшается в присутствии одновалентной меди Cu(I), а разработанный протокол не требует дополнительных лигандов и протекает с превосходными выходами. Данные работы показали увеличение скорости реакции на 3–4 порядка и привели к региоселективному образованию 1,4-дизамещенных триазолов. Скорость реакции еще больше возросла при одновременном применении ультразвука и микроволнового облучения. Метод «клик»-химии был применен для получения широкого спектра 1,4-дизамещенных производных 1,2,3-триазола, начиная с малых молекул и до олигомеров, таких как циклодекстрины [149]. Было показано, что реакции «клик»-химии способны напрямую связывать химические соединения с биологическими объектами, обеспечив таким образом истинно междисциплинарный подход к биофункционализации поверхностей с чрезвычайно широкой областью применения в биосенсорах различных типов.

В работе [151] была продемонстрирована эффективность бескаталитической азид-алкиновой реакции циклоприсоединения для иммобилизации различных молекул на твердой

поверхности и микрогранулах. Описан эффективный синтез азидабензоциклооктинов из недорогих прекурсоров, что позволило получить их в больших масштабах. В ходе работы различные поверхности модифицировали азидабензоциклооктином для иммобилизации азидсодержащих субстратов посредством «клик»-реакции (рисунок 23). В качестве альтернативы, конъюгированные с азидабензоциклооктином молекулы закрепляли на модифицированной азидом поверхности. Обе методики иммобилизации хорошо работали в водных растворах и демонстрировали отличную кинетику в условиях нормальной окружающей среды. Также данная «клик»-реакция была использована для присоединения молекул полиэтиленгликоля к нефункционализированным участкам поверхности. Такая обработка позволила значительно снизить или полностью исключить неспецифическое связывание белков с поверхностью.

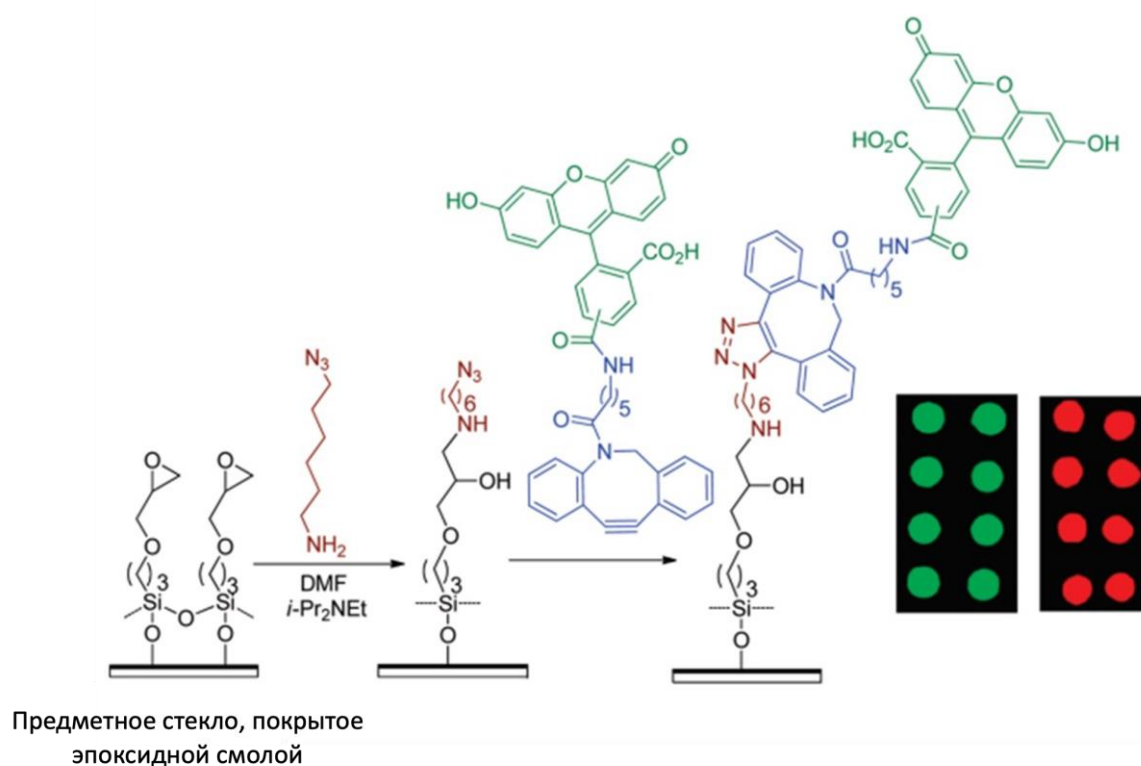


Рисунок 23 – Схематическое представление модификации поверхности, покрытой эпоксидной смолой, с последующей безмедной «клик»-иммобилизацией азидабензоциклооктина

Биоортогональная медь(I), которая катализирует циклоприсоединение азидов и алкинов (CuAAC), широко используется для модификации азид- или алкинсодержащих моносахаридов на метаболических гликоинженерных клетках млекопитающих [152] (рисунок 24). N-ацетил-D-глюкозамин, функционализированный азидной группой, проникает в цитозоль путем диффузии через мембрану, подвергается деацелированию и активации в клеточных органеллах (в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме), после чего присоединяется к гликозилированным белкам. Последние транспортируются на поверхность

клетки и становятся доступными для проведения «клик»-реакции, катализируемой медью (I) CuAAC или реакции, стимулированной напряжением цикла (SPAAC), для которой не требуется использования меди.

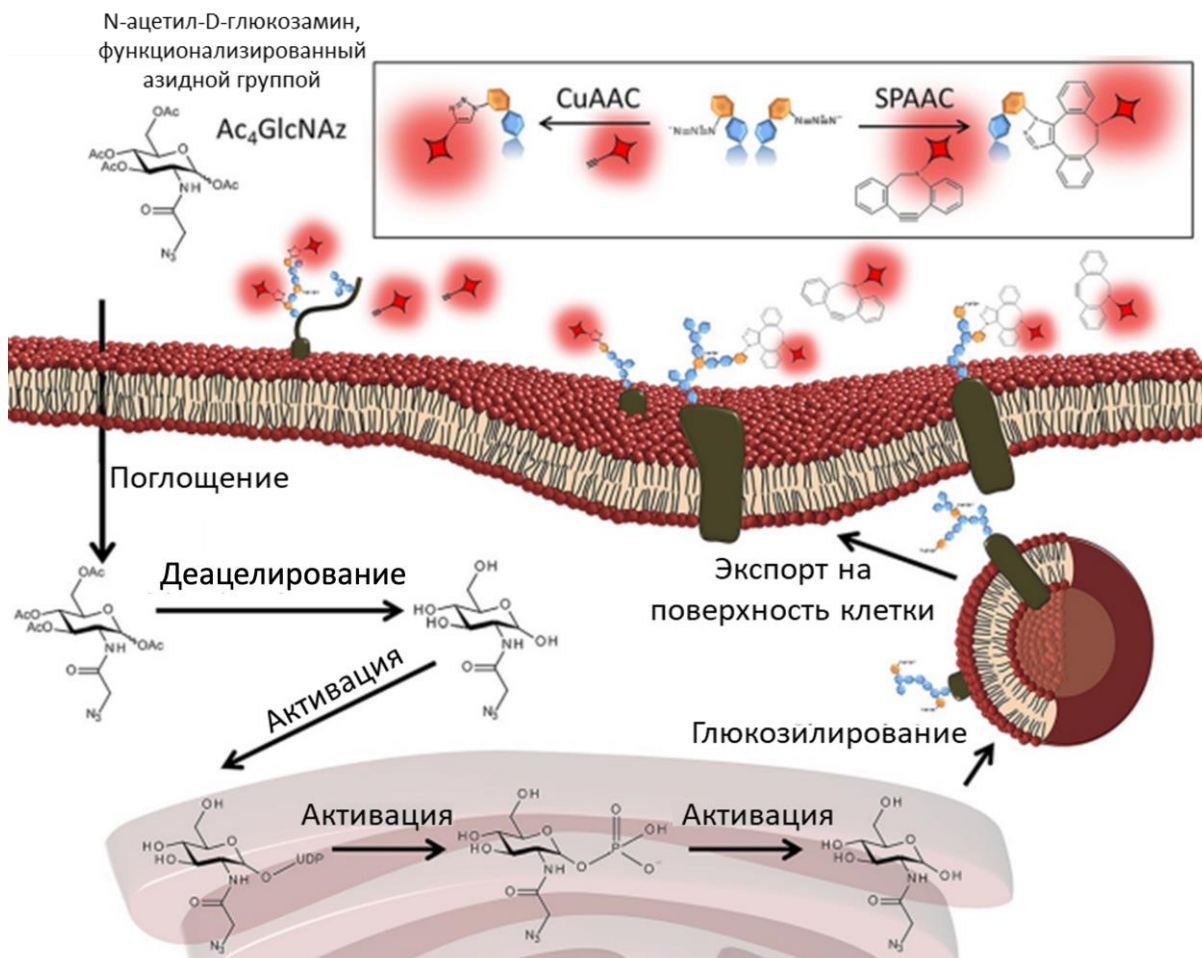


Рисунок 24 – Модификация поверхности клеток и мечение модифицированных гликопротеинов с помощью «клик»-реакций CuAAC и SPAAC

«Клик»-реакции с использованием меди (I) в качестве катализатора обладают рядом преимуществ по сравнению с реакциями без катализатора. Они показывают более быструю кинетику реакции [153] с возможным использованием для проведения реакции более стабильных исходных веществ [154]. Несмотря на вышеописанные преимущества использования меди, при модификации клеточной поверхности существует ряд ограничений, связанных с неизбежным воздействием катионов меди, имеющих высокую цитотоксичность, на клетки поверхности. Токсичность меди связана с образованием активных форм кислорода, что приводит к разрывам цепей ДНК [155], окислительным процессам [156], а также расщеплению [157] и сшиванию аминокислот в белках [158]. Сообщаемая цитотоксичность катионов меди варьируется от 0,1 до 1000 мМ [159], что обусловлено, по крайней мере частично, различными условиями культивирования клеток в исследованиях. В работе [152] подробно описаны проблемы проведения клик-реакции CuAAC с живыми клетками, и

обоснована необходимость разработки безопасного протокола для эффективного и быстрого модифицирования живых гликоинженерных клеток. Установлено, что правильный выбор условий модификации клеток имеет важное значение для обеспечения целостности клеточной мембраны, сохранения клеточного метаболизма и предотвращения реакций апоптоза. Определен диапазон цитотоксического действия медного катализатора на фибробласты NIH 3T3 и клетки HEK 293-F. Мониторинг целостности мембран с помощью проточной цитометрии и ПЦР-анализа с использованием апоптотических и антиапоптотических маркеров показал общую осуществимость клик-реакции CuAAC и позволил сделать вывод о том, что время воздействия реакционной смеси CuAAC оказывает основное влияние на биосовместимость. Показано, что с помощью CuAAC была быстро достигнута высокая эффективность мечения клеток HEK293-F флуоресцентным алкиновым красителем по сравнению с циклоприсоединением азиды и алкина, не содержащим меди (SPAAC). В исследовании подробно описаны биосовместимые условия модификации гликоинженерных клеток с помощью CuAAC по сравнению с его альтернативным вариантом без меди. Ранние исследования в этой области продемонстрировали возможность биоконъюгации на основе CuAAC в живых клетках. Жизнеспособность клеток определяли по продукции АТФ как индикатору метаболически активных клеток HeLa, CHO и Jurkat после обработки азидными моносахаридами и после реакции CuAAC. Основное внимание уделялось различным соотношениям между CuSO_4 и лигандом трис-гидроксипропилтриазилометиламина (THPTA) [160]. Также была описана оптимизация реакции CuAAC с точки зрения типов восстановителя, лиганда и буферной системы в отношении генерации АФК. Анализы пролиферации и поглощения ионов Cu^{I} и Cu^{II} проводились при различных концентрациях лиганда Cu^{II} (от 2 до 1 мМ, включая комплексообразующие лиганды этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трис(бензилтриазилометил)амин (TBTA), трис(гидроксипропилтриазилометил)амин (THPTA), бисфенол S (BPS) или L-гистидин) без присутствия аскорбиновой кислоты в клетках Huh7.5, MDA-MB-468, HEK 293T и HeLa в течение 24 часов для определения наиболее эффективного лиганда Cu^{II} с наименьшим цитотоксическим эффектом.[161] Большинство исследований цитотоксического действия CuAAC ограничивали анализ жизнеспособности клеток оценкой пролиферации клеток.

Целью исследования [160] было определение проектного пространства для реакции CuAAC с учетом цитотоксичности для клеток в фибробластах NIH 3T3, полученных от мышей, и клеток HEK 293-F, полученных из почек человека. Реакция CuAAC на живых клетках проводилась в соответствии с существующими протоколами [162, 163]. CuSO_4 , THPTA и L-аскорбат натрия предварительно смешивали и инкубировали в течение 10 минут перед использованием во всех экспериментах для снижения образования активных форм

кислорода и, таким образом, ограничения окислительного воздействия. Традиционные реакции CuAAC (50–200 мМ CuSO₄, THPTA в молярном соотношении 1:5 и 2,5 мМ L-аскорбата натрия в качестве восстанавливающего агента) хорошо переносились в течение 20 минут в случае фибробластов NIH 3T3 без критической потери жизнеспособности клеток (>90 % жизнеспособности клеток через 5 и 10 мин; 70 % жизнеспособности клеток через 20 мин); не наблюдалось долгосрочных побочных эффектов в отношении окрашивания диацетата флуоресцеина FDA и пропидиний йодида PI (100 % жизнеспособности клеток). Аналогичные результаты наблюдались и для клеток HEK 293-F. Реакция «клик»-химии хорошо переносилась в течение 20 минут, при этом жизнеспособность клеток была равна жизнеспособности необработанных клеток. Интересно, что только время воздействия смеси для «клик»-химии, а не концентрация катионов меди (50-200 мМ CuSO₄), критически влияло на жизнеспособность клеток. Предполагалось, что образование АФК в результате реакции CuAAC было основной причиной увеличения количества PI-положительных клеток (что указывает на потерю целостности клеточной мембраны) после воздействия смеси для «клик»-химии, как это наблюдалось при времени воздействия, превышающем 20 минут инкубации. Эта гипотеза была подтверждена образованием перекиси водорода во время реакции CuAAC, концентрация которой удвоилась через 2 минуты реакции и продолжала увеличиваться до 60 минут.

В литературе представлено несколько примеров функционализации самоорганизующихся монослоев триазольными связями, первыми такие работы выполнили Коллман и Чидси [165-169], их исследования преимущественно были направлены на изучение самоорганизующихся монослоев на золотых поверхностях. Другие научные группы расширили область применения данной методики на разные типы подложек, включая кремниевые и стеклянные пластины [170-171], предложив схему модификации, изображенную на рисунке 25. В продолжение работы в этой области ряд научных групп проводили функционализацию поверхностей полимерными композитами, применяя Cu-катализируемые реакции азид-алкинового циклоприсоединения. В литературе описано множество различных покрытий для самых разнообразных применений. К ним относятся некоторые ковалентно связанные поверхностные слои и многие физически адсорбированные полимерные покрытия. Примерами являются моно-, ди- и трихлорсиланы, этокси- и метоксисиланы, полимерные покрытия, такие как полимеры, полученные из акриламида, полимеры, полученные из целлюлозы, полиэтиленоксид (ПЭО) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) [172], поливиниловый спирт, олигоуретаны и полиэтиленимин (ПЭИ) [173]. Проведение модификации позволило улучшить функциональные свойства модифицированных поверхностей, такие как механическая прочность и химическая стойкость.

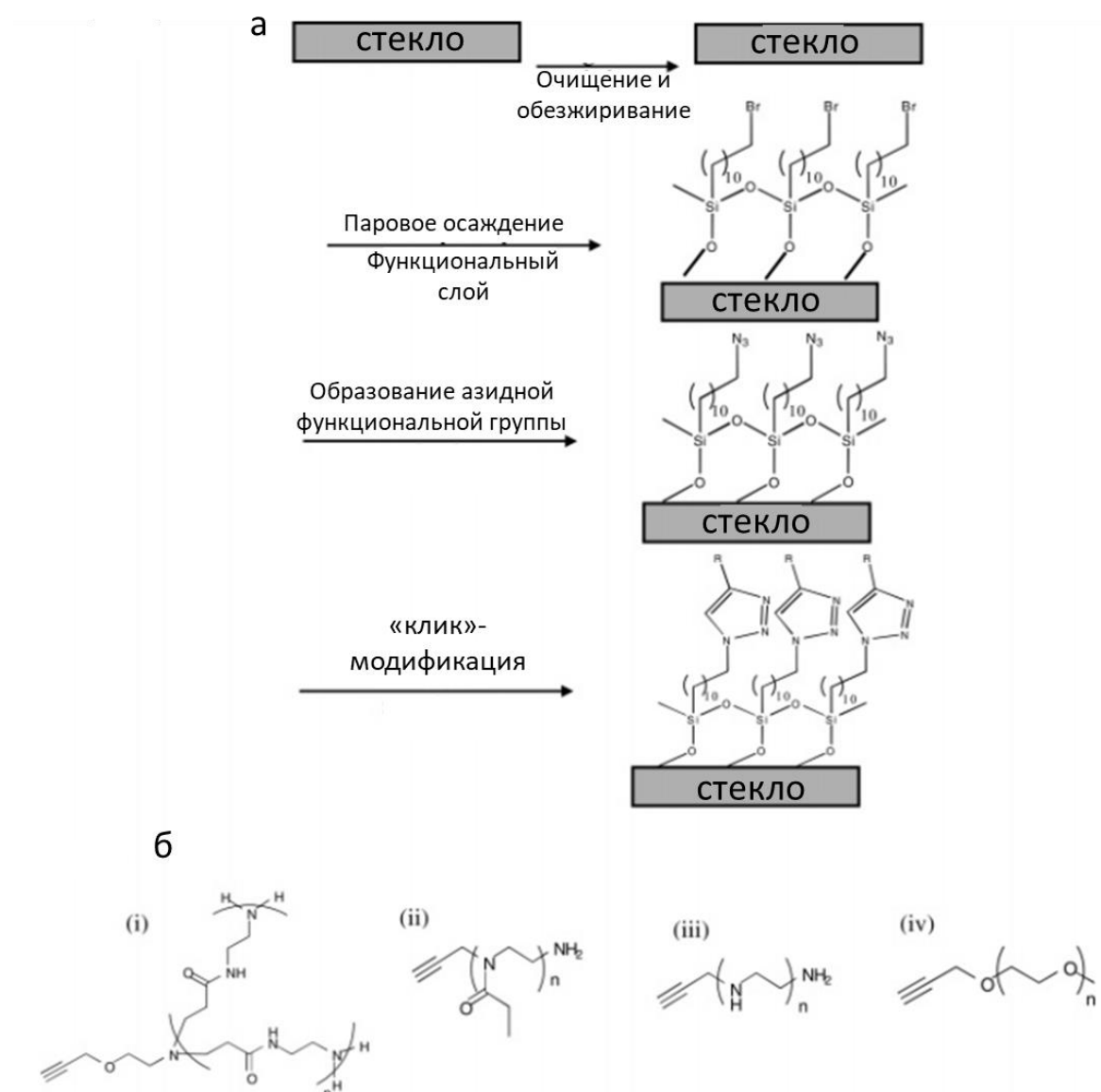


Рисунок 25 – (а) Схема «клик»-модификации стеклянных поверхностей с использованием силанов; (б) примеры химических структур различных покрытий, разработанных для «клик»-модификации стеклянных поверхностей

Чой с коллегами в [174] выбрали «клик»-реакцию в качестве потенциально возможной для связывания между полимерными поверхностями и целевыми молекулами, а также сформировали азидные группы на конце небоообрастающей полимерной пленки поли(олиго(этиленгликоль)метакрилата). Реакция эффективно протекала на полимерных поверхностях с различными ацетиленами, содержащими различные функциональные группы, такие как метильные, гидроксильные, карбоксильные и сложноэфирные группы. В качестве модели для биоконъюгации биотин был иммобилизован на пленке поли(олиго(этиленгликоль)метакрилата) с помощью «клик»-химии, и было продемонстрировано специфическое распознавание стрептавидина на изготовленном устройстве.

Проведение «клик»-реакции на поверхности в том числе может быть перспективным решением при модификации поверхности для изготовления биосенсоров на основе органических электролитических транзисторов. Впервые такой метод изготовления биоузнающего слоя ОЭХТ-биосенсора был использован G.E. Fenou с соавт. в работе [175] (рисунок 26), где было описан синтез и характеристика азидпроизводного мономера 3,4-этилендиокситиофена (ЭДОТ, EDOT) (азидометил-EDOT, EDOT-N3), а также его осаждение на золотые электроды методом электрополимеризации с образованием PEDOT-N3 модифицированного ОЭХТ. Разработанный протокол электрополимеризации обеспечивал возможность настройки характеристик ОЭХТ, позволяя изготавливать транзисторы с более низким пороговым напряжением (близким к 0 В), чем у современных устройств на основе ПЭДОТ, а также с более высоким значением передаточной проводимости, что является критически важным фактором для создания эффективных биосенсоров. Азидные фрагменты, присутствующие в PEDOT-N3, использовались для связывания молекул, содержащих алкины, таких как окислительно-восстановительные зонды и элементы биоузнавания. Метод «клик-химии» с использованием модифицированного алкином биотина позволил эффективно применить взаимодействие авидин–биотин для создания биоконструкций с белками и ферментами. Была проверена возможность использования модифицированного дибензоциклооктином тромбоспецифического аптамера HD22 для потенциального применения данных устройств в качестве биосенсоров на основе ОЭХТ. Спустя год эта же группа авторов исследовала различные аспекты функционализации изготовленных ОЭХТ [176]. Исследования каналов разной архитектуры показали, что модифицированный азидом PEDOT-N3 обладает достаточной проводимостью для эффективного функционирования ОЭХТ на его основе. Пространственный контроль функционализации осуществляли с помощью окислительно-восстановительных зондов в различных условиях. Также была продемонстрирована «клик»-реакция для дибензоциклооктин-производного поли-L-лизина без использования медного катализатора Cu(I). Эта функционализация позволила дополнительно закрепить аптамер HD22, и создать ОЭХТ-устройства для обнаружения тромбина, обладающие антимикробными свойствами. Разработанные биосенсоры имели более высокую плотность иммобилизованного на поверхности ОЭХТ аптамера по сравнению с предыдущими архитектурами, что было подтверждено более высоким сенсорным откликом при распознавании целевого аналита.

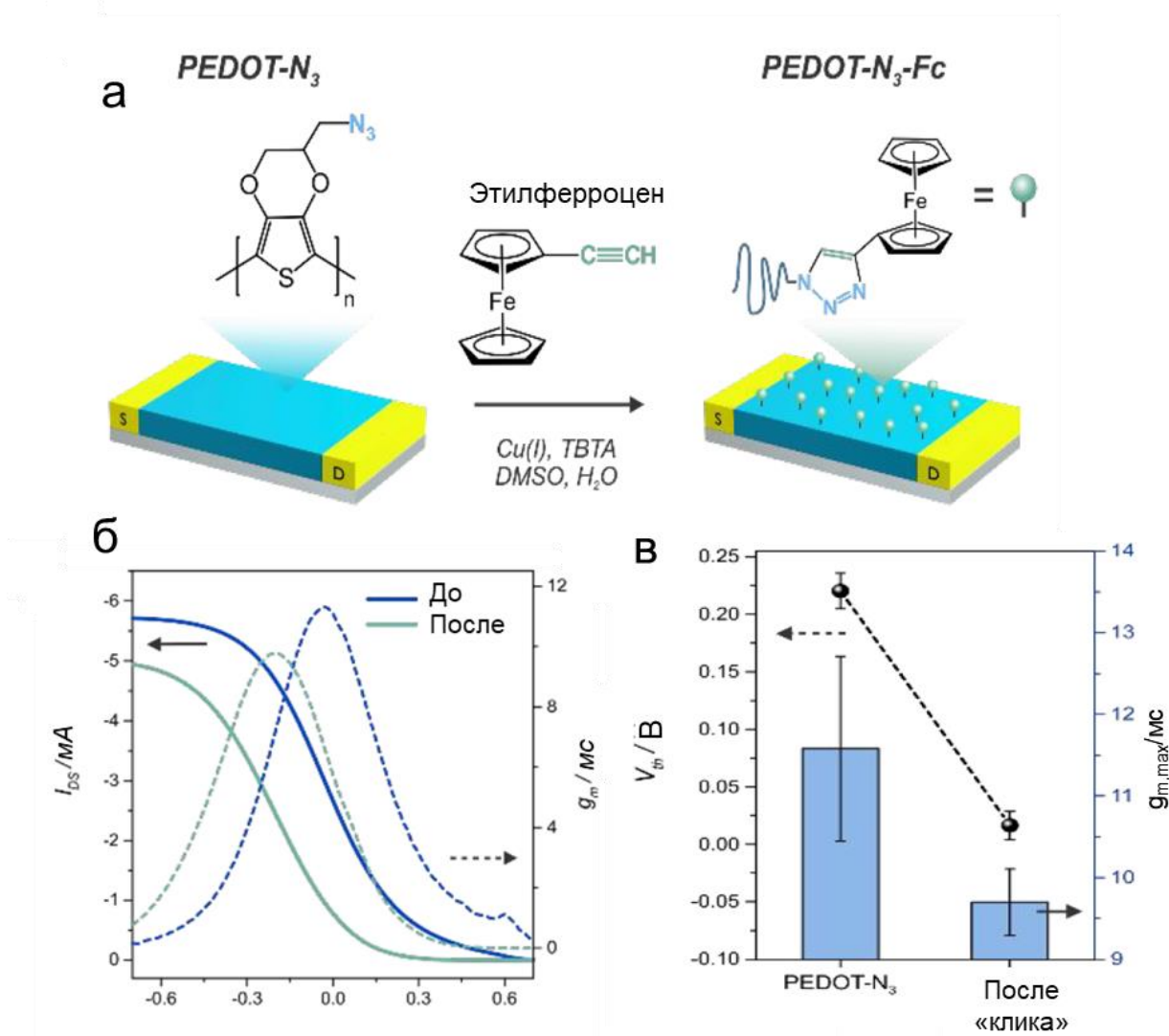


Рисунок 26 – (а) Схема функционализации ОЭХТ с помощью «клик-реакции» с использованием этинилферроцена; (б) кривые передаточных характеристик ОЭХТ, модифицированного для PEDOT-N₃ до и после «клик-реакции» ($V_{\text{DS}} = -0,1 \text{ В}$, $1 \times \text{PBS}$); (в) пороговое напряжение и максимальная передаточная проводимость для PEDOT-N₃ ОПТЭЗ до и после «клик-реакции»

Таким образом, представленные литературные данные подтверждают перспективность использования «клик»-реакции для биофункционализации поверхности сенсорных устройств в очень широком диапазоне возможных применений, включая модификацию живых клеток. При этом на момент написания литобзора данных о работах по биофункционализации ОПТЭЗ с использованием «клик»-реакций в доступной литературе найти не удалось.

1.5. Изготовление многоразовых биосенсоров

В настоящее время биосенсорные устройства, созданные на базе ОПТЭЗ, широко востребованы за счёт их сверхвысокой чувствительности и селективности при обнаружении разнообразных биологических аналитов. При этом одним из ограничений для массового

применения ОПТЭЗ-биосенсоров является их высокая стоимость при возможности только однократного использования, что типично для большинства опубликованных систем. Данный раздел посвящен описанию опубликованных подходов к созданию многоразовых биосенсорных систем на основе ОПТЭЗ.

Как было детально описано в Разделе 1.1, ОПТЭЗ могут иметь различную архитектуру в зависимости от положения электрода затвора относительно канала транзистора и расположения биоузнающего слоя, отвечающего за селективность и чувствительность устройства [29, 34]. Биоузнающий слой может быть нанесен как на поверхность электрода затвора [22, 37, 177, 178], так и на поверхность полупроводникового слоя [34, 179-181]. Возможны варианты, когда биоузнающий слой не контактирует ни с затвором, ни с полупроводниковой поверхностью, а находится внутри электролита [25, 26, 182], кроме того, узнающие элементы могут располагаться на плавающем затворе в геометрии транзистора с боковым затвором [183-185]. В современной биосенсорике подавляющее большинство устройств на основе ОЭХТ и ОПТЭЗ являются одноразовыми устройствами. Возможность восстановления характеристик ОЭХТ и ОПТЭЗ к первоначальному состоянию после события сенсорного определения с целью повторного использования таких устройств остаётся актуальной научной проблемой, для решения которой на момент написания литобзора было предложено только ограниченное число подходов.

Так, описано перспективное решение этой задачи, связанное с применением расщеплённого аптамера в составе ОЭТ-биосенсора для обнаружения α -глюкозидазы, позволяющее использовать устройство до пяти раз. В работе предложен биосенсор для определения активности α -глюкозидазы и скрининга ингибиторов, основанный на генерации и восстановлении сигнала, активируемого ферментом. Аптамер аденозинтрифосфата расщепляется на два аптамера, причем второй может связывать золотые наночастицы, модифицированные первым аптамером и 4-аминофенил- α -d-глюкопиранозидом. В результате функциональные наночастицы золота могут быть иммобилизованы на поверхности золотого электрода, что позволяет осуществлять регенерацию под действием соли хлорида натрия. [192]. В присутствии α -глюкозидазы гликозильная группа 4-аминофенил- α -d-глюкопиранозида отщепляется, и электроактивные фенольные гидроксильные группы обеспечивают появление сильного отклика по току. Кроме того, биосенсор можно восстановить, инкубируя его в воде для диссоциации наночастиц золота, модифицированных первым аптамером и 4-аминофенил- α -d-глюкопиранозидом. Устройство продемонстрировало хорошую чувствительность к определению α -глюкозидазы с пределом обнаружения 0,005 Ед/мл и могло быть использовано повторно с хорошей воспроизводимостью путем промывки водой.

Описанный в [193] гидрогелевый электролит на основе целлюлозы со способностью к регенерации уксусной кислотой и одновременным включением ионов в целлюлозную матрицу был разработан для его применения в электрохимических устройствах на основе тонкопленочных транзисторов из оксида индия-галлия-цинка или бумажной электроники с возможностью вторичной переработки. Полученные пленки электролита на основе целлюлозы обладали высокой удельной емкостью, были прозрачными и гибкими, что обусловило возможность их применения в гибких электрохимических устройствах, таких как биосенсоры или электролитические транзисторы. Изготовленные транзисторы на основе оксида индия-галлия-цинка на стекле с ламинированными гидрогелевыми электролитами на основе целлюлозы в качестве подзатворного диэлектрика показали низкое рабочее напряжение (< 2 В), хорошее соотношение токов включения/выключения ($I_{on/off} = 10^6$), передаточную проводимость и подвижность носителей заряда. Также были продемонстрированы гибкие транзисторы с целлюлозой в качестве подзатворного диэлектрика на бумаге. Достигнутое сочетание гибкости электролитических транзисторов на бумаге с возможностью их многократного использования представляет собой важный шаг в направлении создания биоразлагаемых функциональных материалов в сочетании с одноразовыми/перерабатываемыми недорогими электронными устройствами.

Только одна опубликованная работа посвящена использованию полимерных мембран, интегрированных в органические электролитические транзисторы, где ключевым узнающим элементом сенсора стала наноструктурированная изопористая мембрана из поли(стирол-б-4-винилпиридина), функционализированная молекулами конго красного (рисунок 27) [194]. В этой работе органический электрохимический транзистор использовали для обнаружения агрегатов бета-амилоида в сыворотке крови человека *in vitro*. Распространенным патологическим изменением в мозге, пораженном болезнью Альцгеймера, является именно накопление бета-амилоида, который может образовывать бляшки. Канал ОЭТ был интегрирован с наноструктурированной изопористой мембраной, обладающей сильным сродством к агрегатам бета-амилоида. Механизм обнаружения основан на том, что мембрана захватывает агрегаты бета-амилоида, размер которых превышает размер ее пор, и тем самым блокирует проникновение ионов электролита в расположенный под ней канал. Таким образом, ток стока изменяется в зависимости от количества агрегатов, адсорбированных из электролита. Благодаря сочетанию высокой передаточной проводимости ОЭТ с известной пористостью и селективностью мембраны, устройство с высокой чувствительностью обнаруживало наличие агрегатов бета-амилоида в образцах сыворотки крови человека. Сенсор линейно обнаруживал агрегаты бета-амилоида в диапазоне концентраций от 2,21 пМ до 221 нМ в буфере и образце сыворотки крови человека, в диапазоне стандартных физиологических

концентраций. Возможность замены биофункционализированной изопористой мембраны, интегрированной с транзистором для биосенсорного анализа, позволила создать маломощный, неинвазивный многоразовый датчик для ранней диагностики болезни Альцгеймера.

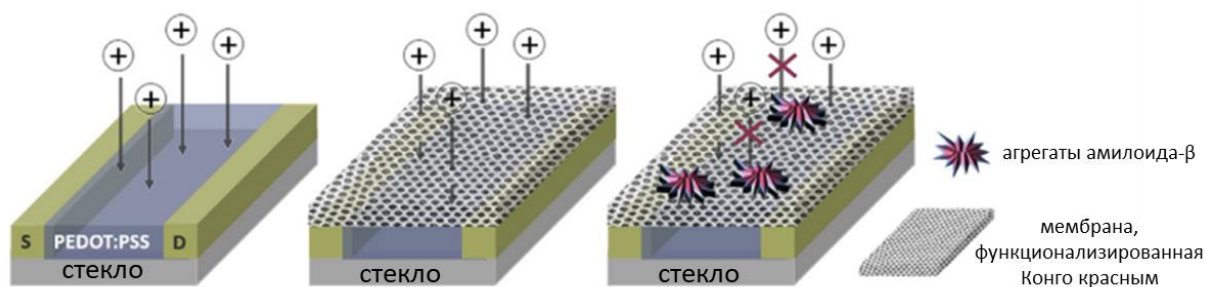


Рисунок 27 – Конфигурация ОЭТ-биосенсора с мембраной

В целом полимерные трековые мембраны могут служить узнающими элементами при обнаружении различных классов аналитов. В отличие от других мембран, полимерные трековые мембраны имеют гладкую поверхность, что позволяет выбирать плотность и форму пор, а также их желаемый диаметр в диапазоне от 5 нм до 10 мкм. Кроме того, трековые мембраны обладают узким распределением размеров пор. Трековые мембраны имеют широкий спектр применения, от фильтрации до использования в качестве проницаемых носителей. Благодаря высокой локализации рассеиваемой энергии, быстрые тяжелые ионы создают непрерывные следы повреждений (латентные треки), состоящие из сильно деградированного материала с повышенной химической реактивностью. В результате полимеры, облученные тяжелыми ионами, становятся анизотропными и сильно неоднородными в нанометровом масштабе. Проницаемость облученных ионами полимерных пленок может быть значительно улучшена за счет облучения ультрафиолетовым излучением и извлечения продуктов радиолиза. Химическое травление используется для дальнейшей модификации структуры облученных ионами полимеров и получения микро- и наноструктурированных мембран. Различные методы ионного трекового травления позволяют создавать асимметричные нанопоры, форму и размеры которых можно контролировать по желанию. В электролитных растворах асимметричные нанопоры, полученные методом трекового травления, обладают уникальными транспортными свойствами, что обеспечивает платформу для разнообразных применений, включая биомиметические наножидкостные устройства, преобразование энергии, биохимические датчики и т.д. [186]. Также стоит отметить возможность различных модификаций трековых мембран. Например, модификация кремнийорганическими соединениями или полимерами позволяет изменять гидрофильные и гидрофобные свойства, что повышает эффективность фильтрации эмульсий [187].

С помощью ионотрековой технологии были получены [188] микропористые полиэтилентерефталатные мембраны диаметром до 10 мкм и проанализированы особенности их формирования. В качестве основы для последующей модификации были выбраны мембраны диаметром 5,0 и 7,5 мкм и толщиной 15,5 и 14,3 мкм соответственно. Ионно-трековые мембраны были модифицированы поливиниловым спиртом в концентрации до 0,5% для изменения гидрофильно-гидрофобного баланса поверхности и повышения биосовместимости. Углы смачивания поверхности мембраны уменьшились с 53° до 33° (при диаметре микропор 5 мкм) и с 57° до 47° (при 7,5 мкм) при максимальной концентрации поливинилового спирта. Пилотное исследование возможности применения модифицированных ионно-трековых мембран для разделения биологических объектов на примере суспензии клеток рака легких человека показало, что мембраны с диаметром пор 7,5 мкм, покрытые 0,5% раствором поливинилового спирта, позволяют отделять клетки от суспензии без пролиферации клеточных мембран. Доступность полимерных мембран в сочетании с простотой функционализацией их поверхности с помощью модифицирующего слоя поливинилового спирта демонстрирует высокий потенциал применения модифицированных ионно-трековых мембран для разделения биологических объектов и использования в методе изоляции опухолевых (и трофобластических) клеток по их размеру (Isolation by Size of Epithelial Tumor / Trophoblastic Cells, ISET). Трековые мембраны хорошо подходят для использования в качестве подложки или многоразового слоя для биосенсоров, поскольку на поверхности мембраны можно иммобилизовать антитела, белки или аптамеры, что позволяет селективно изолировать биологические объекты, такие как раковые клетки [189], ДНК [190] или вирусы. [191].

В последнее время растет интерес к использованию нанопористых полимерных мембран в составе резистивно-импульсных сенсоров для обнаружения как низкомолекулярных, так и макромолекулярных аналитов. Метод включает измерение импульсов тока, связанных с перемещением аналита через нанопору как сенсорный элемент. Ключевой задачей для этой сенсорной платформы является обеспечение селективности протокола, чтобы импульсы тока для целевого аналита можно было отличить от импульсов тока для других веществ, возможно присутствующих в образце. В работе [195] показано, что селективности с белковым аналитом можно достичь путем добавления в анализируемый раствор антител, которые избирательно связываются с белком-аналитом. Также продемонстрирована концепция использования бычьего сывороточного альбумина и фрагмента из поликлонального антитела, связывающего бычий сывороточный альбумин (БСА). Поскольку комплекс, образующийся при связывании поликлонального антитела с БСА, больше, чем свободная молекула альбумина, отклик по импульсу тока на

образовавшийся комплекс БСА с антителом легко отличается от отклика на свободный БСА. Кроме того, импульсы комплекса БСА с антителом легко отличить от импульсов, полученных для свободного поликлонального антитела, и от импульсов, полученных для контрольного белка, который не связывается с поликлональным антителом. Что немаловажно, показано, что сигнал импульса тока для комплекса БСА с антителом может предоставить информацию о его размере и стехиометрии.

В работе [196] для селективного резистивного импульсного измерения БСА, а также для быстрого захвата молекул белка с отличным соотношением сигнал/шум использовали конические мембраны, функционализированные полиэтиленгликолем (рисунок 28).

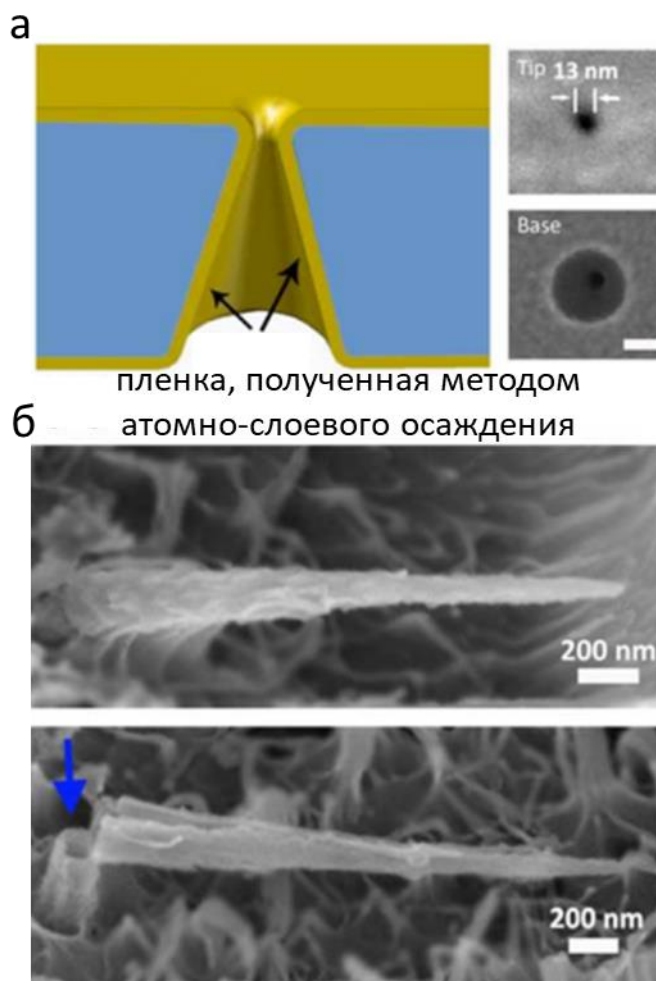


Рисунок 28 – (а) Схематическое изображение равномерной пленки, полученной методом атомно-слоевого осаждения на одном коническом наноканале (масштаб не соблюден). (б) СЭМ-изображения конических фрагментов Al_2O_3 , полученных путем нанесения покрытия на конические наноканалы. Сломанный участок (синяя стрелка) показал, что покрытие нанесено только на стенку поры

Был подробно описан простой и эффективный подход к модификации отдельных конических полимерных наноканалов методом атомно-слоевого осаждения Al_2O_3 для детектирования одиночных молекул БСА. Наноканалы были изготовлены методом трекового травления с последующим нанесением высококонформного покрытия из Al_2O_3 .

Преимуществом использования метода является возможность точного контроля толщины осаждаемого слоя и настройки геометрии кончика наноканала: его размер лишь незначительно превышает размер анализируемого белка БСА, обеспечивая высокую чувствительность детектирования. Положительно заряженный слой Al_2O_3 , нанесённый на стенки наноканала, слабо взаимодействует с отрицательно заряженными молекулами БСА. Данное взаимодействие замедляет перенос молекул через канал. Кроме того, в исследовании показан особый механизм транслокации в модифицированных методом атомно-слоевого осаждения наноканалах. Он включает переходные процессы перераспределения ионов, возникающие при адсорбции или десорбции молекул БСА на поверхности поры. Эти процессы вызывают значительные изменения ионного тока. В результате достигается высокое отношение сигнал/шум для транслокации. Дополнительно было установлено, что модифицированные наноканалы демонстрируют высокую скорость захвата аналита — параметр, критически важный для биосенсорных приложений.

Наноканальная мембрана [197] в сочетании с ДНК-аптамерами позволила создать высокочувствительный биосенсор, способный распознавать молекулы кокаина с хорошей селективностью. Наблюдалась линейная зависимость между концентрацией целевого кокаина и выходным ионным током в широком диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ кокаина, показывая предел обнаружения до уровня 1 нМ. Изготовленный биосенсор на основе наноканалов и аптамеров показал лучшую чувствительность и селективность к кокаину по сравнению с традиционными сенсорами на кокаин на основе одних только аптамеров. Данный результат подтверждает, что интеграция одиночных наноканалов с функциональными аптамерами может быть эффективным способом разработки новых биосенсорных устройств для сверхчувствительного и селективного обнаружения наркотиков, а также в области медицины, здравоохранения, пищевой промышленности и экологии.

На основе изменений вольт-амперных характеристик (рисунок 29) был описан процесс иммобилизации ДНК-аптамеров внутри цилиндрических нанопор мембран, которые использовались для специфического и селективного распознавания молекулы лизоцима [198]. Конъюгация аптамера с белком в ограниченном пространстве создает неоднородное фиксированное распределение заряда, происходящее в переходной зоне распределения заряда вдоль поры, что приводит к изменению электрических характеристик. Предполагается, что на основе модуляции транспортных свойств нанопор такие нанопористые системы могут быть применены для обнаружения и распознавания различных белков и малых органических молекул, проявляющих сродство к определенному аптамерному зонду.

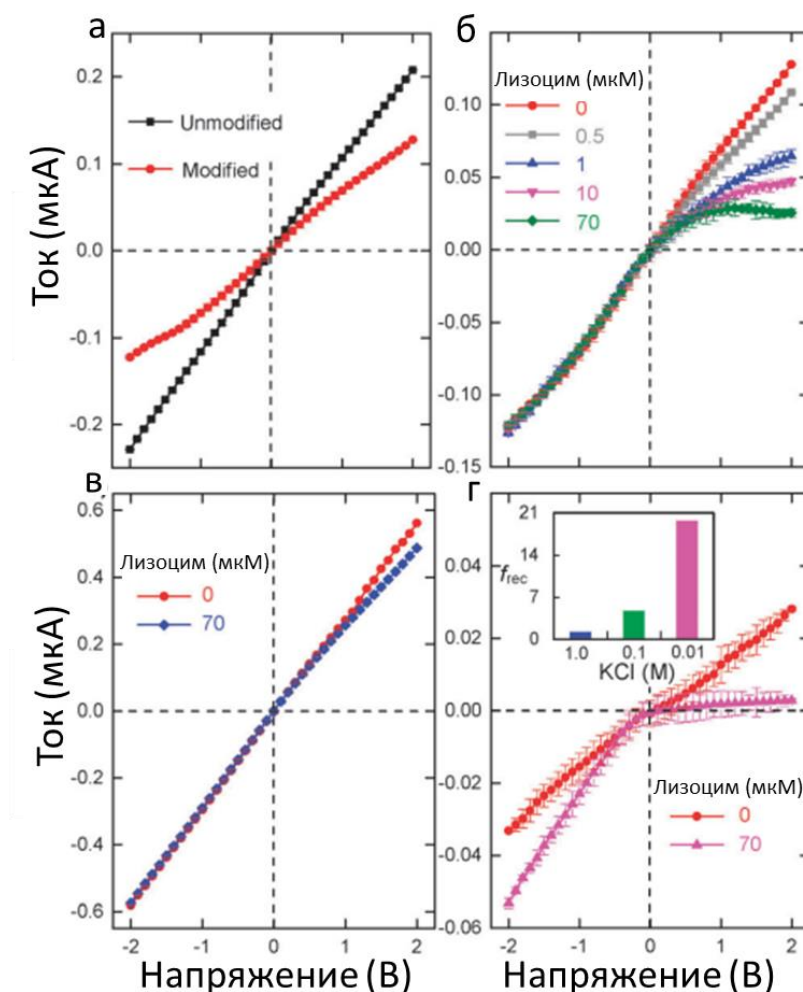


Рисунок 29 – Вольт-амперные характеристики одиночной цилиндрической нанопоры (диаметр 25×3 нм) в растворе 0,1 М КСl (рН 7,2), полученные (а) до и после иммобилизации ДНК-аптамера, (б) при асимметричном воздействии на модифицированную пору (диаметр 20×3 нм) различных концентраций белка. (в) и (г) вольт-амперные характеристики модифицированной поры, измеренные в растворах 1 М и 10 мМ КСl (рН 7,2), соответственно. На вставке к рисунку (г) показано отношение ректификации, полученное при различных концентрациях КСl

Сочетание мембранной фильтрации и SERS-активного субстрата в одном растворе привело к эффективной адсорбции вирусов из раствора на покрытые аптамером наночастицы серебра и позволило проводить специфическое определение вируса гриппа А аптамером, помеченным рамановской активной меткой [199]. Разработанный подход позволяет эффективно сорбировать вирусы из раствора на покрытые аптамером наночастицы серебра, при этом SERS-сигнал от метки уменьшался с уменьшением концентрации целевого вируса. Даже наличие нескольких вирусных частиц в образце приводило к увеличению интенсивности SERS-спектра, при этом для взаимодействия аптамера с вирусом требовалось всего несколько минут. Предел обнаружения аптасенсора составлял всего 10 ВЧ/мл вируса гриппа А или 2 ВЧ/мл на зонд, что превышает предел обнаружения методов ПЦР ($\sim 10^3$ ВЧ/мл). Предложенный авторами биосенсор очень удобен для применения в условиях оказания

медицинской помощи на месте. Применяемые полимерные мембраны характеризуются долговечностью, химической инертностью и хорошей устойчивостью к воздействию электролитных растворов, традиционно используемых в биосенсорных системах.

В работе [200] представлен колориметрический биосенсор для быстрого и чувствительного выявления сальмонелл. Платформа состояла из иммунных наночастиц золота и платины (Au@Pt NPs) (для специфической маркировки бактерий), мешалки с двумя последовательными воздушными камерами (для эффективного проведения иммунореакции) и трековой мембраны (в качестве микрофильтра заданного размера для селективной изоляции бактерий от избытка несвязанных иммунных Au@Pt NPs). Образец бактерий и иммунные Au@Pt NPs вносили в смесительную камеру и тщательно перемешивали. Перемешивание осуществляли за счёт многократного нажатия и отпускания малой воздушной камеры, что позволило точно контролировать объём воздуха и обеспечивать эффективное образование конъюгатов бактерий с иммунными Au@Pt NPs. Таким образом были сформированы конъюгаты, после чего проводили их фильтрацию и очистку. Малую и большую воздушные камеры одновременно нажимали, направляя весь раствор из смесительной камеры через микрофильтр. На мембране улавливались образовавшиеся конъюгаты большего размера, в то время как несвязанные иммунные Au@Pt NPs меньшего размера удалялись. Затем в микрофильтр вносили субстрат. Каталитическая активность конъюгатов запускала реакцию, приводящую к изменению цвета. Был проведен количественный анализ цветового сигнала и идентификации бактерий. Разработанный биосенсор позволил обнаружить сальмонеллу в концентрации всего 168 колониеобразующих единиц/мл за 25 минут.

Интеграция наноматериалов, в том числе металлических наночастиц и углеродных наноструктур, существенно расширяет функциональные возможности трековых мембран за счёт повышения электропроводности, каталитической активности и площади поверхности, что улучшает передачу сигнала. Эти достижения подчёркивают потенциал трековых мембран для создания датчиков следующего поколения, способных решать критически важные задачи в области здравоохранения, экологического мониторинга и промышленных приложений [201-203].

Несмотря на то, что радиус действия электростатических взаимодействий в растворах электролитов, как правило, ограничивается длиной экранирования Дебая (λ) [204], ряд исследований демонстрирует возможность реализации биосенсорных систем на основе электролитически управляемых графеновых полевых транзисторов при локализации целевого аналита даже за пределами этого расстояния [205], что выходит за рамки классического дебаевского приближения [17]. Данный факт подтверждает перспективность применения

полимерных трековых мембран в составе ОПТЭЗ-биосенсоров — в том числе в конфигурациях, где мембрана пространственно отделена от токонесущего слоя.

Таким образом, полимерные трековые мембраны потенциально представляют собой перспективный рецепторный слой для ОПТЭЗ-биосенсоров, на который могут быть иммобилизованы узнающие элементы, например, ДНК-аптамеры. Простота замены такой биофункционализированной мембраны должна обеспечить возможность неоднократного использования биосенсора на основе ОПТЭЗ.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Анализ данных, описанных в мировой литературе и представленных в **Главе 1**, позволяет сделать вывод о том, что каждый функциональный слой в составе органического полевого транзистора с электролитическим затвором (полупроводниковый, рецепторный и биоузнающий) способен оказывать значительное влияние на сенсорные свойства ОПТЭЗ-устройства в жидкой фазе. Основную роль в данном случае играет не только химическая структура применяемых материалов, но и архитектура самого устройства, а также методы формирования функциональных слоев, их морфология и толщина. Влияние нехимических факторов, таких как морфология и толщина слоя, напрямую зависящих от метода формирования слоя, для жидкостных биосенсорных устройств выражено сильнее, чем для ранее изученных газовых сенсоров на основе органических полевых транзисторов, поскольку водные растворы электролитов, особенно обладающие высокой ионной силой и содержащие большое количество белковых и других заряженных компонентов, представляют собой агрессивную среду для органических полупроводниковых материалов и зачастую приводят к быстрой деградации устройств, что не позволяет обеспечить их многократное использование.

При этом систематические данные о взаимосвязи вышеперечисленных факторов с сенсорными свойствами ОПТЭЗ в литературе практически не рассмотрены, поскольку большая часть описанных ОПТЭЗ-биосенсоров основана на функционализации биоузнающим слоем электрода затвора, а не на функционализации полупроводникового слоя, как это было реализовано в работах лаборатории молекулярных сенсорных технологий и устройств ИСПМ РАН с целью дальнейшего обеспечения технологичного подхода к созданию мультисенсорного устройства на одной подложке. Поставленные вопросы требуют не только прикладных решений, но и фундаментального понимания механизмов влияния вышеперечисленных факторов на проявляемые ОПТЭЗ сенсорные свойства. Такое понимание позволит эффективно выбирать подходы к созданию ОПТЭЗ-устройств, пригодных для практического применения в режиме многократного использования и имеющих заданные характеристики чувствительности и селективности по отношению к различным целевым анализам, в т.ч. в реальных биологических жидкостях.

На момент планирования цели и задач данного исследования в лаборатории молекулярных сенсорных технологий и устройств ИСПМ РАН был разработан подход к функционализации полупроводниковой поверхности ОПТЭЗ, изготовленной из смеси 2,7-диоктилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена (**C8-BTBT-C8**) и полистирола методом дозирующего лезвия путем нанесения биорецепторного слоя. Биорецепторный слой наносили методом Ленгмюра-Шеффера поверх полупроводника с использованием смеси силоксанового димера [1]бензотиено[3,2-B][1]бензотиофена (**BTBT**) - 1,3-бис{11-(7-

гептил[1]бензотиено[3,2-b] [1] бензотио-2-ил)гексил}-1,1,3,3-тетраметилдисилоксана, **D2-Hept-BTBT-Hex** и биотинилированного производного BTBT (**Und-BTBT-Hex-biotin**), обеспечивая так называемые «якоря» для биоаналитов на поверхности полупроводника, что позволило создать универсальную платформу для дальнейшей биомодификации поверхности. Был продемонстрирован специфический отклик изготовленных ОПТЭЗ-устройств на вирус гриппа А (штамм H7N1). Нерешенными оставались задачи оптимизации разработанного подхода к созданию биорецепторного слоя с целью увеличения технологичности процесса и обеспечения работы устройства в широком спектре реальных биологических жидкостей; создания ОПТЭЗ-устройств, способных к многократному использованию, а также создания мультисенсорного устройства на одном чипе, что и послужило основанием для проведения данной работы.

Учитывая существующий на момент постановки задачи уровень исследований в области жидкостных биосенсоров, а также остающиеся нерешенными вопросы, была сформулирована следующая цель диссертационной работы: разработать подходы к созданию рецепторных (полимерных и низкомолекулярных) слоев жидкостных биосенсоров на основе органических полевых транзисторов с электролитическим затвором для селективного обнаружения и определения содержания различных вирусов в растворах, в т.ч. в биологических жидкостях.

В качестве материалов для создания полупроводниковых слоев были выбраны органические соединения, имеющие в своем составе сопряженное ядро на основе [1]бензотиено[3,2-B][1]бензотиофена (BTBT), поскольку такая структура сопряженного фрагмента хорошо зарекомендовала себя с т.з. химической и термоокислительной стабильности, а также проявляемых полупроводниковых свойств в предыдущих исследованиях, в т.ч. в области газовой сенсорики. В качестве рецепторных слоев использовали полимерные и низкомолекулярные производные BTBT, содержащие биотиновый фрагмент, обеспечивая благодаря данному фрагменту биотин-стрептавидиновое взаимодействие для дальнейшей иммобилизации узнающих элементов, а также трековые мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ), позволяющие иммобилизовать узнающие элементы непосредственно в порах мембраны. Узнающими элементами для целевых и контрольных аналитов, в качестве которых выбрали вирусы гриппа А и Б, болезни Ньюкасла и аллантоисную жидкость для сравнения, являлись ДНК-аптамеры. (Рисунок 1).

Выбранные материалы изучали в составе многослойных органических полевых транзисторов с электролитическим затвором. Базовая архитектура ОПТЭЗ-устройства представляла собой трехэлектродную систему на кремниевой или стеклянной подложках, состоящую из нижних золотых контактов стока и истока, нанесенных методом вакуумного

напыления, слоя органического полупроводника и платиновой проволоки (электрода затвора), помещенной в раствор электролита. В ходе исследований полупроводниковый слой в базовой структуре модифицировали, формируя поверх него рецепторные и узнающие слои, либо используя в качестве таких слоев полимерную трековую мембрану с иммобилизованными в поры ДНК-аптамерами (Рисунок 1). Статистическую достоверность результатов обеспечивали путем измерения образцов, каждый из которых содержал по 20 (для кремниевой подложки) или 5 (для стеклянной подложки) единичных транзисторов на одной подложке; полученные для единичных транзисторов данные усредняли.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Установить влияние химического строения рецепторного и полупроводникового материалов, а также различных методов изготовления рецепторного слоя на электрические и сенсорные характеристики ОПТЭЗ;
2. Разработать подход к изготовлению биосенсорных ОПТЭЗ-устройств для многоразового использования, в т.ч. в биологических жидкостях;
3. Разработать подход к созданию мультисенсорного ОПТЭЗ-устройства на одном чипе для одновременного определения нескольких аналитов.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы для изготовления ОПТЭЗ и биосенсоров на их основе

Синтез органического полупроводника (ОП) для формирования полупроводникового слоя ОПТЭЗ – 2,7-диоктилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена (**C8-BTBT-C8**) был выполнен, как описано в [206] к.х.н. М.Б. Полинской в лаборатории функциональных материалов для органической электроники и фотоники ИСПМ РАН. Органический полупроводник 1,3-бис{11-(7-гептил[1]бензотиено[3,2-b][1]бензотио-2-ил)гексил}-1,1,3,3-тетраметилдисилоксан (**D2-Hept-BTBT-Hex**) и биотинсодержащее производное диалкилбензотиенобензотиофена (**BTBT-биотин**) для биотинилированного биорецепторного слоя ОПТЭЗ были синтезированы согласно методикам, описанным в [207] и [34], соответственно, к.х.н. М.С. Скоротецким в лаборатории функциональных материалов для органической электроники и фотоники ИСПМ РАН. Схемы синтеза несимметричного дизамещённого алкильного производного [1]бензотиено[3,2-b][1]бензотиофена (BTBT) - **BTBT-alkyne** и азид-производного биотина представлены в работах [1] и [208] и были выполнены к.х.н. М.С. Скоротецким в лаборатории функциональных материалов для органической электроники и фотоники ИСПМ РАН. Статистические силоксановые гребнеобразные сополимеры различного состава, содержащие в своем составе боковые группы 2-ундецил-7-гексилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена, а также боковые группы биотинзамещенного 2-ундецил-7-гексилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена были синтезированы Е.А.Сорокиной в лаборатории функциональных материалов для органической электроники и фотоники ИСПМ РАН. Все синтезированные вещества были полностью охарактеризованы современными физико-химическими методами исследования, подтвердившими их химическую структуру и чистоту.

Органические растворители (ацетон, изопропанол) были приобретены у компании Acros Organics, полистирол (ПС) ($M_w = 280\,000$) был приобретен у компании Sigma-Aldrich, указанные растворители и полимер использовали без предварительной обработки. Растворители (толуол, диметилсульфоксид) перед использованием перегоняли на роторном вакуумном испарителе. «Клик»-реакцию проводили в буферном растворе ацетата триэтиламмония ($pH=7,0$) непосредственно на поверхности ОПТЭЗ по описанной далее методике. Таблетки фосфатно-буферного солевого раствора (PBS 10 мМ, $pH\ 7,4$) были приобретены у компании Ecoservice (Россия). Для удаления слоя хромовой маски использовали травильную ванну «Церий». Этот раствор был свежеприготовлен в следующих пропорциях: нитрат церия(IV) (Acros Organics, Бельгия) : хлорная кислота (Acros Organics, Бельгия) : деионизированная вода = 10,9% : 4,25% : 84,85%. Для удаления золотых пленок

использовали травильную ванну «Йод». Состав этого раствора следующий: йодид калия (Sisco Research Laboratories, Индия) : йод (I₂, Sisco Research Laboratories, Индия) : деионизированная вода = 4 : 1 : 40.

Буферы с различным pH были приготовлены на основе фосфатно-солевого буфера (PBS, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,35) с добавлением растворов NaOH или HCl для достижения целевых значений pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,3 и 8,0. Значения pH контролировали с помощью pH-метра ST20 (Ohaus Corporation, Парсиппани, Нью-Джерси, США). AgNO₃ был приобретен у компании Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Сверхчистая деионизированная вода с сопротивлением 18,2 МОм была получена с помощью деионизатора Akvilon D-301 (Россия).

Стрептавидин был приобретен у компании Sigma-Aldrich. ДНК-аптамеры были синтезированы компанией «Синтол» (Москва, Россия). Использовали следующие последовательности: 1) биотинилированный аптамер BV42 к Ag⁺/H⁺/гемагглютинуину вируса гриппа А (биотинил-5'-d(AACGCTCACTCCCCCAAGAAGAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGTGAGCGTT)-3'); 2) аптамер RHA0385 к гемагглютинуину вируса гриппа А (5'-d(TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT)-3'); 3) биотинилированный аптамер RHA0385 к гемагглютинуину вируса гриппа А (биотинил-5'-d(TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT)-3'); 4) биотинилированный compRHA0385, комплементарная последовательность к RHA0385 (биотинил-5'-d(AACCCCCGCCCTCCCAAAATAACCCCAA)-3'); 5) биотинилированный аптамер RBD-1C, контрольный аптамер, специфичный к S-белку SARS-CoV-2 и неспецифичный к вирусу гриппа А (биотинил-5'-d(CAGCACCGACCTTGTGCTTTGGGAGTGCTGGTCCAAGGGCGTTAATGGACA)-3'). Аптамер для осаждения на мембраны, содержащий SH-группу, RHA0385 (5'-(SH-(CH₂)₆)-d(TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT)-3') был приобретен у компании «Синтол» (Москва, Россия). Для образования необходимых конформаций аптамеров олигонуклеотиды сворачивали при концентрации 2 мкМ в фосфатно-солевом буфере (PBS), доведенным до целевого pH (6,0, 7,0 или 8,0). Процесс сворачивания проводили следующим образом: раствор нагревали при 95 °C в течение 5 мин и использовали после охлаждения до комнатной температуры. Для образования двойной спирали между RHA0385 и compRHA0385 эти два олигонуклеотида инкубировали вместе в PBS при концентрации каждого аптамера 2 мкМ.

Целевые и контрольные вирусы были предоставлены Федеральным научным центром им. Чумакова по исследованиям и разработке иммунологических и биологических продуктов Российской академии наук. Использовали штамм вируса гриппа А A/chicken/Rostock/45/1934

(H7N1), вакцинный штамм вируса болезни Ньюкасла (NDV), вирус гриппа Б и аллантоисную жидкость. Вирусные запасы размножали в аллантоидной полости 10-дневных эмбрионов цыплят, свободных от специфических патогенов. Яйца инкубировали при 37°C, охлаждали до 4°C в течение 48 часов после заражения и собирали через 16 часов. Дизайн исследования был одобрен Комитетом по этике Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, Москва, Россия (разрешение № 4 от 2 декабря 2014 г.). Вирусы инактивировали добавлением 0,05% (об/об) глутарового альдегида, консервировали добавлением 0,03% (вес/об) NaN₃ и хранили при +4°C.

У здорового добровольца брали мазок из носа, вводя тампон в носовую полость с последующим замачиванием в PBS. Образцы биологических жидкостей разбавляли в 2 раза рабочим буфером перед анализом. Стандартная человеческая плазма приобретена у компании Siemens Healthineers (Марбург, Германия).

2.2 Изготовление фотошаблонов и электродов методом литографии

Литография контактов транзисторов на стеклянных подложках была выполнена в Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, в Центре технологии и микропроизводства. Геометрию электрода для последующего многократного использования ОПТЭЗ-биосенсора создавали с использованием хромированного стеклянного фотошаблона. Все процессы микроизготовления проводили в условиях чистой комнаты ISO 5 в. Использовали заготовки фотошаблонов с хромовым слоем толщиной 70 нм и слоем позитивного фоторезиста толщиной 0,6 мм (PHF 127 × 127 × 2,3 F1-0,1A, NIIMV, Россия). Фоторезист формировали с помощью лазерного генератора прямого действия PicoMaster 100 (4PICO Litho, Нидерланды) с лазерной головкой 405 нм. Последующие процедуры проводили в полуавтоматическом боксе для влажного травления (Stroza 721, Чехия). Экспонированный фоторезист образован с помощью раствора проявителя UPF-1b (1:4; Frast, Россия) в деионизированной воде в течение 45 секунд. Затем фотошаблон немедленно промывали деионизированной водой и высушивали потоком чистого азота. Хром удаляли с обработанных участков с помощью травильной ванны с церием в течение 35 секунд при перемешивании. Затем фотошаблон промывали дистиллированной водой и сушили в атмосфере азота. Неэкспонированный фоторезист удаляли ацетоном и изопропиловым спиртом. Наконец, фотошаблон промывали дистиллированной водой и сушили в потоке азота.

Электроды формировали из золотой пленки, покрывающей всю стеклянную пластину. В качестве подложки использовали пластину из боросиликатного стекла GL24009 диаметром

100 мм и толщиной 0,5 мм (Siegert Wafer, Германия). Пластину очищали в растворителях: ацетоне и изопропаноле. Для повышения адгезии золотой пленки наносили 10-нм промотирующий слой хрома, а затем основной 40-нм слой золота методом термического испарения. Последующие этапы литографии микроструктуры электродов проводили в условиях чистой комнаты ISO 5. Золотую поверхность промывали изопропиловым спиртом и дистиллированной водой, а затем сушили в потоке чистого азота. На золотую поверхность методом центрифугирования при 3000 об/мин в течение 60 секунд (Sawatec SM200, Швейцария) наносили позитивный фоторезист Microposit S1813 G2 (Dow Chemical, Германия). Фоторезист запекали при 115 °С в течение 2 минут (Sawatec HP200, Швейцария). После этого фоторезист экспонировали через подготовленную фотомаску с помощью экспонометра и выравнивателя масок NXQ4006 (Neutronix Quintel, США). Последующие этапы проводили в полуавтоматическом боксе для влажного травления (Stroza 721, Чехия). Экспонированный фоторезист удаляли с помощью раствора проявителя AZ 726 MIF (Merck, Германия) в течение 40 секунд. Раствор проявителя смывали дистиллированной водой, а затем пластину сушили в потоке азота. Слой золота удаляли с проявленных участков с помощью травильной ванны с йодом в течение 40 секунд при перемешивании, после чего пластину промывали дистиллированной водой и сушили в атмосфере азота. Наконец, промотирующий слой хрома удаляли с помощью травильной ванны с церием в течение 5 секунд при перемешивании, после чего пластину снова промывали водой и сушили в атмосфере азота. После завершения литографии пластину разделяли на отдельные чипы с электродами с помощью автоматизированного станка для резки Accretech SS10 (Япония). Непроявленный фоторезист использовали в качестве защитной золотой пленки во время процесса резки и транспортировки. Остатки фоторезиста удаляли непосредственно перед экспериментами с помощью ацетона и изопропилового спирта. Наконец, электродные устройства промывали дистиллированной водой и сушили в атмосфере азота.

2.3 Изготовление ОПТЭЗ

В качестве подложек использовали пластины, описанные в разделе 2.2, а также предварительно промытые в растворителях сильно легированные кремниевые пластины n-типа с термически выращенным SiO_x (толщиной 300 нм). В случае кремниевых пластин золотые гребенчатые электроды стока и истока с длиной канала $L = 50$ мкм и шириной канала $W = 18230$ мкм, при соотношении $W/L = 364,6$, были нанесены методом термического напыления через трафаретную маску. Затем пластины с электродами обрабатывали кислородной плазмой в течение 5 секунд. При изготовлении биосенсоров с использованием

«клик»-реакции в качестве подложек использовали пластины из стекла Borofloat GL24009 размером 20 мм×15 мм (Siegert Wafer, Германия). Предварительно стеклянную пластину последовательно отмывали в ацетоне и изопропанолe. Для улучшения адгезии наносили подслои хрома толщиной 5 нм, а затем методом литографии золотые контакты стока и истока толщиной 40 нм, ширина канала транзистора W составила 4 мм, длина L - 20 мкм.

Для лучшей инжекции заряда в слой органического полупроводника контакты истока и стока были модифицированы слоем 2,3,4,5,6-пентафтортиофенола (PFBT) в соответствии с процедурой, описанной в [34]. В качестве электролита использовали деионизированную воду (18,2 МО), раствор хлорида натрия NaCl с концентрацией 0,1 М, а также фосфатно-солевой буферный раствор (PBS, pH 7,4). Электрод затвора представлял собой платиновую проволоку, погруженную в электролит.

C8-BTBT-C8 и полистирол смешивали в массовом соотношении 4:1 и растворяли в толуоле до общей концентрации 18 мг/мл. Для проведения «клик»-реакции на поверхности затем к полученной смеси добавляли синтезированное производное BTBT с алкиновой группой **BTBT-alkyne** в концентрациях 0, 1, 10 и 20 мас.% от содержания **C8-BTBT-C8**. Таким образом, были получены следующие соотношения смесей **C8-BTBT-C8** : ПС : **BTBT-alkyne** : 4:1:0, 4:1:0,04, 4:1:0,4 и 4:1:0,8, соответственно. Нанесение смесей проводили методом дозирующего лезвия с помощью Film Applicator Coatmaster 510 (Erichsen, Nemer, Германия) при 85°C, скорости 10 мм/с и высоте ножа 650 мкм, как описано в [210,211] (рисунок 30), в результате чего получали пленку органического полупроводникового слоя толщиной в среднем 40 нм.

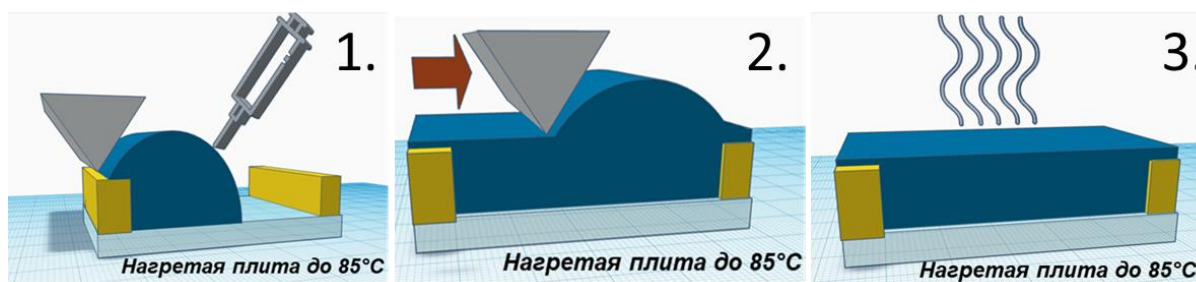


Рисунок 30– Изготовление ОПТЭЗ методом дозирующего лезвия

Раствор **D2-Hept-BTBT-Hex** в толуоле ($C=0,33$ мг/мл) готовили и использовали для изготовления рецепторного слоя методом Ленгмюра-Шеффера (рисунок 31), как описано в [207], в результате чего была получена тонкая (несколько монослоев) пленка органического полупроводника. Данные собирали с помощью системы Nima 712BAM (Nima, Великобритания) с использованием тефлоновой ванны и барьеров при комнатной температуре. Для ряда изготовленных устройств при исследовании влияния толщины

полупроводникового слоя на сенсорные свойства устройств перед нанесением пленки **D2-Hept-BTBT-Hex** методом Ленгмюра-Шеффера на подложку с электродами методом дозирующего лезвия был нанесен интерфейсный слой полистирола из раствора толуола ($C=3,6$ мг/мл).

D2-Hept-BTBT-Hex ($C=0,33$ мг/мл в толуоле) и **BTBT-биотин** ($C=0,33$ мг/мл в диметилсульфоксиде) смешивали в массовом соотношении 19:1 и наносили методом Ленгмюра-Шеффера для изготовления биосенсора с 5% **BTBT-биотина** на поверхности без подслоя органического полупроводника. Для изготовления биоузнающего слоя с 30% **BTBT-биотина** на поверхности тонких или толстых слоев органического полупроводника использовали соотношение **D2-Hept-BTBT-Hex** : **BTBT-биотин** = 7:3. Перед изготовлением пленки Ленгмюра-Шеффера с 5% BTBT-биотина на подложку был нанесен интерфейсный слой полистирола из раствора толуола методом дозирующего лезвия ($C=3,6$ мг/мл).

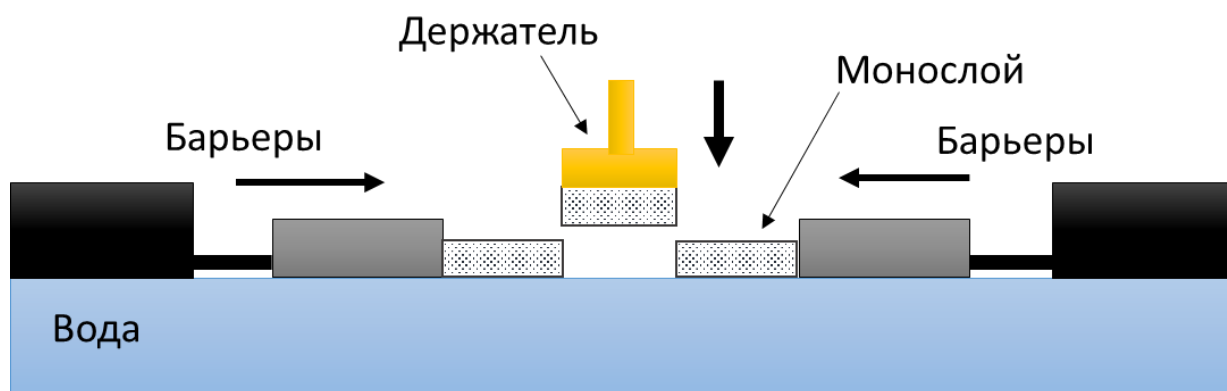


Рисунок 31 – Изготовление рецепторного слоя ОПТЭЗ методом Ленгмюра-Шеффера

Для изготовления многоразовых биосенсоров использовали трековые мембраны с диаметром пор 0,035, 0,06, 0,4 и 1,0 мм. Трековые мембраны были изготовлены из полиэтилентерефталатной (ПЭТ) пленки (Mitsubishi Polyester Films) в Лаборатории ядерных реакций им. Флерова Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна, Россия). Процедура получения включала облучение быстрыми тяжелыми ионами с последующей сенсibilизацией мягким УФ-светом и химическим травлением в растворах гидроксида натрия [212]. Дисперсность пор, определяемая как стандартное отклонение диаметров отдельных пор на фотографиях поверхности мембран, полученных с помощью электронной микроскопии, составила 10–12%.

2.4 Методика проведения «клик»-реакции на поверхности

Для проведения «клик»-реакции использовали стандартный протокол [157], который был адаптирован для исследуемых объектов. Производное биотина с азидной функциональной группой (**биотин-N₃**) растворяли в ДМСО в количестве, соответствующем 1,5-кратному избытку по отношению к содержанию **ВТВТ-alkyne** в слое полупроводника. Затем к полученному раствору последовательно добавляли буферный раствор ацетата триэтиламмония (pH=7,0) ($C_{\text{в конечном растворе для «клика»}}=2 \text{ М}$) и водный раствор аскорбиновой кислоты ($C_{\text{в конечном растворе для «клика»}}=500 \text{ мкМ}$). Отдельно для получения Cu (I) водный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($C=10 \text{ мМ}$) и раствор триэтиламина (0,1 М в 55% ДМСО) смешивали в соотношении 1:1 ($C_{\text{Cu (I) в конечном растворе для «клика»}}=0,5 \text{ мМ}$). После добавления полученного раствора Cu (I) к раствору с **биотин-N₃** был получен раствор для «клик»-реакции с содержанием ДМСО 50%. Стеклянные подложки с ОПТЭЗ-платформой для «клик»-реакции, содержащей **ВТВТ-alkyne** в концентрациях 0, 1, 10 и 20 мас.% от содержания **С8-ВТВТ-С8** были погружены в полученный раствор для проведения функционализации слоя за счет «клик»-реакции. Основываясь на ранее опубликованных исследованиях, «клик» реакцию проводили в течении 2 часов при постоянном перемешивании раствора [149, 150].

2.5 Обнаружение аналитов ОПТЭЗ-биосенсорами с биоузнающим слоем, нанесенным методом Ленгмюра-Шеффера

ОПТЭЗ с биорецепторным слоем последовательно обрабатывали для получения биоузнающих слоев следующим образом: 1) иммобилизация стрептавидина (раствор 100 мг/л в PBS, pH=7,4), промывка PBS и H₂O после 10 минут инкубации; 2) иммобилизация биотинилированного аптамера при соответствующем pH, промывка PBS и H₂O после 10 минут инкубации. Вышеупомянутая процедура обеспечивает специфическое связывание каждого слоя. Исследование влияния неспецифических взаимодействий на характеристики биосенсора было описано ранее в работе [34].

Биосенсорное определение проводили путем иммобилизации на модифицированных ОПТЭЗ жидкостей, содержащих вирус гриппа А (штамм H7N1, $6,1 \times 10^9$ вирусных частиц на мл, разбавленном PBS в соотношении 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10 000; 1/100 000) или контрольные вирусы (B/Victoria/2/1987, $6,1 \times 10^9$ вирусных частиц на мл, вирус болезни Ньюкасла, $3,6 \times 10^9$ вирусных частиц на мл) или аллантоисную жидкость, все разбавленные PBS в соотношении 1/100; 1/10 000). После 10-минутной инкубации проводили промывание PBS и H₂O. Такая процедура обеспечивает специфическое связывание каждого слоя.

Измерения чувствительности к рН модифицированного аптамером i-мотив ОПТЭЗ проводили в диапазоне рН 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 и 8,0 как в прямом, так и в обратном направлениях на одном и том же чипе, но с использованием разных пикселей для каждого направления.

Обнаружение вирусов проводили по методике, описанной выше. Для экспериментов с вирусными частицами аптамер i-мотив BV42 был свернут при рН 6,0 для получения необходимой конформации аптамера для захвата вируса гриппа А.

Эксперименты по определению чувствительности к ионам серебра проводили путем инкубации модифицированных аптамерами ОПТЭЗ в растворах с концентрацией AgNO_3 в диапазоне от 6 нМ до 1250 нМ. Измерения проводили с использованием одного и того же устройства, при этом концентрация Ag^+ увеличивалась от самой низкой до самой высокой. Для этих экспериментов аптамер BV42 был свернут при рН 7,3, чтобы получить необходимую конформацию аптамера для захвата Ag^+ .

2.6 Характеристика поверхностей функциональных слоев ОПТЭЗ

Формирование органического полупроводникового, рецепторного слоев, а также поверхности трековых мембран контролировали с помощью атомно-силового микроскопа FemtoScan (Центр передовых технологий, Москва, Россия) в резонансном режиме. Использовали высокоразрешающий кремниевый кантилевер ACM NSG10 (типичная резонансная частота 240 кГц (гарантированный диапазон: 140–390 кГц), типичная силовая постоянная 11,8 Н·м⁻¹ (гарантированный диапазон: 3,1–37,6 Н·м⁻¹)). Для обработки сигналов и получения изображений использовали программное обеспечение FemtoScan Online (Центр передовых технологий, Москва, Россия). Также с помощью атомно-силовой микроскопии (Solver Next, NT-MDT, Россия) исследовали морфологию поверхности в полуконтактном режиме с использованием кремниевого АСМ-кантилевера высокого разрешения NSG10 (резонансная частота 240 кГц). Поляризационную оптическую микроскопию проводили на всех этапах изготовления устройств с использованием микроскопа Carl Zeiss Axioscop A40Pol (Германия). Морфологию поверхности мембран изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе SU8020 (Hitachi, Япония). Для улучшения разрешения и контраста изображений на образцы был нанесен тонкий слой сплава Pt–Pd толщиной 5 нм. Поверхность трековых мембран исследовали с помощью СЭМ на всех этапах эксперимента: исходная мембрана, мембрана после нанесения золота, мембрана с золотом, модифицированным аптамером и вирусом гриппа, а также контрольные образцы.

2.7 Функционализация поверхности ОПТЭЗ с помощью мембран

При изготовлении многоразовых устройств в качестве элементов биоузнавания в составе ОПТЭЗ-биосенсора использовались трековые мембраны (кусочки размером 2 мм × 5 мм). Мембраны обрабатывали следующим образом:

(1) Термическое осаждение золота толщиной 10 нм на поверхность мембраны для последующего прикрепления SH-аптамера. Промывка дистиллированной водой и сушка в потоке азота.

(2) Функционализация поверхности мембраны аптамером RHA0385: использовали раствор аптамера концентрацией 200 нМ в PBS. Мембрану помещали на 20 мин в 500 мл раствора аптамера, после чего проводили промывку в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) и водой для удаления несвязанных аптамеров и солей.

(3) Захват вирусов. В качестве аналитов использовали вирус гриппа А (штамм H7N1) или контрольный образец (вирус болезни Ньюкасла). Мембрану помещали на 20 минут в 500 мл раствора вируса, после чего проводили промывку фосфатно-солевым буфером (PBS) и водой (H₂O) для удаления несвязанных биологических веществ и солей.

2.8 Измерение вольт-амперных характеристик ОПТЭЗ-устройств

Электрические измерения для устройств всех типов проводили с помощью пробстанции (ООО «ПРИНТЭЛТЕХ», Россия) и источника-измерителя Keithley 2634B (Keithley, США) в условиях окружающей среды. В качестве затворного электрода использовали платиновую проволоку (Ø 0,5 мм) во время измерений в капле на поверхности ОПТЭЗ или на мембране на поверхности ОПТЭЗ. Для предотвращения емкостных эффектов устанавливали задержку в 100 мс между подачей напряжения стока/затвора и измерением тока. Каждую кривую измеряли в прямом и обратном сканировании, состоящем из 41 точки в каждом направлении. Время измерения одной кривой составляло около 14 с. Значения подвижности носителей заряда были получены путем аппроксимации передаточных характеристик моделью постепенного канала Шоккли в насыщенном режиме ($V = -0,5$ В) (1):

$$I_{DS} = \mu \frac{WC_i}{2L} (V_{GS} - V_{th})^2 \quad (1)$$

где I_{DS} — ток исток-сток, μ — подвижность носителей заряда, W и L — ширина и длина канала соответственно, C_i — емкость на единицу площади, V_{th} — пороговое напряжение, V_{GS} — напряжение затвор-исток, а V_{DS} — напряжение сток-исток [214]. Характеристика передаточной проводимости в насыщенном режиме рассчитывалась следующим образом [215] (2):

$$g_m = \frac{\partial \sqrt{I_{DS}}}{\partial V_{GS}} (2)$$

2.9 Исследование механизма работы мультисенсорной платформы на основе ОПТЭЗ

Для изучения механизма работы ОПТЭЗ-мультисенсора были проведены измерения при использовании олигонуклеотидов различной длины. Слой стрептавидина был модифицирован комплементарной последовательностью аптамера RHA0385 - compRHA0385 (длина 28 нуклеотидов), или аптамером RHA0385 (длина 28 нуклеотидов), или двойной спиралью, образованной между RHA0385 и compRHA0385 (в сумме 56 нуклеотидов), или аптамером i-мотив BV42 (длина 55 нуклеотидов). Было проведено сравнение откликов устройств с этими четырьмя олигонуклеотидами.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние полупроводниковых и рецепторных материалов на сенсорные характеристики ОПТЭЗ-устройств

Данный раздел посвящен изучению влияния химического строения полупроводниковых и рецепторных материалов, толщины полупроводниковых слоев, а также методов формирования рецепторных слоев на сенсорные свойства органических полевых транзисторов с электролитическим затвором. Результаты проведенных в рамках данного раздела исследований опубликованы в работах:

1. E.Y. Poimanova, E.G. Zavyalova, **E.A. Kretova**, A.A. Abramov, A.A.Trul, O.V. Borshchev, A.K. Keshek, S.A. Ponomarenko, E.V. Agina. Quantitative Detection of the Influenza a Virus by an EGOFET-Based Portable Device // Chemosensors – 2023. - Vol. 11. – P.464. IF =3,7, Q2;
2. **Е.А. Кретьова**, Е.Ю. Пойманова, М.С. Скоротецкий, Е.Г. Завьялова, С.А. Пономаренко, Е.В. Агина. Биорецепторный слой, полученный методом «клик»-химии на поверхности органических полевых транзисторов с электролитическим затвором // Известия Академии наук. Серия химическая – 2025. – Т. 74, №11. – с. 3589-3601. IF=1.7; Q3.

3.1.1. Влияние химического строения и толщины полупроводникового материала на сенсорные характеристики ОПТЭЗ-устройства

Для выявления влияния химического строения и толщины полупроводникового материала на сенсорные характеристики ОПТЭЗ-устройств были выбраны органические полупроводники — 2,7-диоктилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофен (**C8-ВТВТ-C8**) и силоксановый димер [1]бензотиено[3,2-В][1]бензотиофена — 1,3-бис{11-(7-гептил[1]бензотиено[3,2-b] [1] бензотио-2-ил)гексил}-1,1,3,3-тетраметилдисилоксан, **D2-Hept-ВТВТ-Hex** [216]. Выбор вышеупомянутых полупроводников был обусловлен их высокой химической, термической и термоокислительной стабильностью на воздухе и в водной среде, а также высокой подвижностью носителей заряда, достигаемой как в обычных ОПТ [207,216], так и в ОПТЭЗ [34,210].

Оба материала, выбранные в качестве объектов исследования, широко используются как органические полупроводники в органических полевых транзисторах и газовых сенсорах на их основе. Ранее было показано, что силоксановые димеры несимметричных диалкил-ВТВТ производных позволяют создавать на их основе тонкие (вплоть до мономолекулярных)

слои органического полупроводника на большой площади, что обеспечивает сверхвысокую чувствительность (вплоть до десятков млрд. долей) изготовленных из этих материалов ОПТ - газовых сенсоров [218]. В то же время механизмы детектирования аналитов в газовых и жидких средах, лежащие в основе сенсорной чувствительности ОПТЭЗ и ОПТ, сильно различаются из-за различающихся операционных принципов этих типов устройств. В связи с этим актуальным вопросом является установление влияния толщины слоя органического полупроводника на сенсорные свойства ОПТЭЗ.

ОПТЭЗ на основе **C8-BTBT-C8** были изготовлены методом дозирующего лезвия путем нанесения на стеклянную подложку предварительно растворенной в толуоле смеси **C8-BTBT-C8** и полистирола в массовом соотношении 4:1 с общей концентрацией 18 мг/мл. Благодаря микросегрегации фаз BTBT-производного и полистирола, вызванной высокой температурой, полистирол собирается на поверхности подложки, обеспечивая таким образом слой диэлектрика, а **C8-BTBT-C8** образует верхний полупроводниковый слой. Архитектура устройства схематически изображена на Рисунке 32а. Представленная методика позволила изготовить ОПТЭЗ-устройство с блочной пленкой полупроводника, толщина которой ранее была оценена в 40 нм [211].

ОПТЭЗ на основе **D2-Hept-BTBT-Hex** были изготовлены методом Ленгмюра-Шеффера путем горизонтального переноса ленгмюровского слоя **D2-Hept-BTBT-Hex** с поверхности воды на стеклянную подложку, ставшего возможным благодаря амфифильной природе **D2-Hept-BTBT-Hex**. Данный димер содержит в своем составе условно гидрофильную силоксановую якорную группу, которая может образовывать водородные связи с молекулами воды, способствуя формированию стабильной пленки Ленгмюра, а также гидрофобные алкильные цепи и сопряженное BTBT-ядро, которые могут образовывать высокоупорядоченные слои, обеспечивая хорошие электрические характеристики ОПТ на основе ленгмюровского слоя, перенесенного на твердую подложку, а также высокую эксплуатационную стабильность устройства [219]. Архитектура полученного устройства со слоем **D2-Hept-BTBT-Hex** схематически изображена на рисунке 32б.

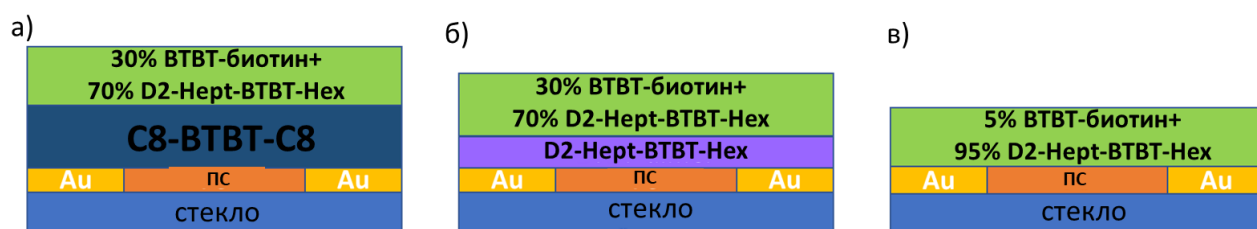


Рисунок 32 – Архитектура ОПТЭЗ-биосенсоров, изготовленных с использованием различных полупроводниковых слоев: (а) **C8-BTBT-C8**; (б) **D2-Hept-BTBT-Hex**; (в) с рецепторным слоем в качестве полупроводникового

Применение низкомолекулярного производного ВТВТ и его силоксанового димера с использованием ранее разработанных методик изготовления полупроводникового слоя обеспечивает соотношение толщин органического полупроводника для **C8-ВТВТ-C8** и **D2-Hept-ВТВТ-Hex** приблизительно 4:1.

Следует отметить, что методы дозирующего лезвия и Ленгмюра-Шеффера масштабируемы и подходят для производства сенсоров, имеющих невысокую стоимость, что особенно важно при разработке портативных устройств для доступного и широкого применения в приложениях для диагностики вне лабораторий (point-of-care devices) [220].

Оба типа изготовленных ОПТЭЗ были функционализированы путем нанесения поверх полупроводникового слоя дополнительного рецепторного слоя (рисунок 32), состоящего из смеси силоксанового димера **D2-Hept-ВТВТ-Hex** и биотин-содержащего производного [1]бензотиено[3,2-В][1]бензотиофена - **ВТВТ-биотина**, структурная формула которого приведена на рисунке 1. Нанесение рецепторного слоя методом Ленгмюра-Шеффера обеспечило поверхности ОПТЭЗ желаемую функциональность для дальнейшего создания на ней биоузнающего слоя, за счет содержащегося в структуре **ВТВТ-биотина** концевой биотинового фрагмента. Биотиновый фрагмент обеспечивает закрепление белка стрептавидина на поверхности полупроводника за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия с дальнейшей функционализацией стрептавидина узнающими элементами на основе различных ДНК-аптамеров, формируя многослойную структуру ОПТЭЗ-биосенсора (Рисунок 33).

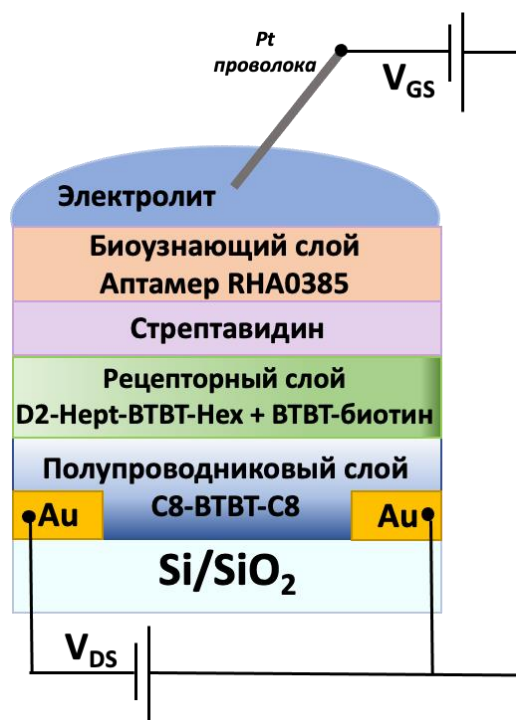


Рисунок 33 – Многослойная структура ОПТЭЗ-биосенсора, содержащего полупроводниковый, рецепторный и биоузнающий функциональные слои

Ранее в нашей лаборатории было показано, что формирование функциональной биотинилированной пленки на поверхности полупроводникового слоя не оказывает существенного влияния на электрические характеристики ОПТЭЗ на основе **С8-ВТВТ-С8** и **D2-Hept-ВТВТ-Нex**, обеспечивая при этом очень близкое к токопроводящему слою расположение участков биоузнавания [34]. Состав рецепторного слоя был также оптимизирован ранее, содержит 30 масс.% **ВТВТ-биотина** в смеси с **D2-Hept-ВТВТ-Нex** и обеспечивает достаточное количество сайтов связывания для молекул стрептавидина при сохранении их стерического размещения на поверхности ОПТЭЗ, что чрезвычайно важно для дальнейшей иммобилизации узнающих элементов и целевых биомолекул-аналитов, а именно ДНК-аптамеров и вирусов.

Третий тип исследуемых ОПТЭЗ-устройств состоял только из рецепторного слоя, выступающего одновременно и полупроводниковым, и не содержал отдельного нижележащего слоя полупроводника, его архитектура схематически изображена на рисунке 32в. Такой подход был использован для проверки гипотезы о возможности изготовления ОПТЭЗ-биосенсора со сверхвысокой чувствительностью по аналогии с использованием полупроводникового монослоя в газовых сенсорах на основе ОПТ, где сверхвысокая чувствительность обеспечивалась за счет непосредственного взаимодействия газа-анализа с токонесущим слоем транзистора [218]. Ранее было установлено, что ОПТЭЗ, не содержащий отдельного полупроводникового слоя, с рецепторным слоем, содержащим 30% **ВТВТ-биотина**, демонстрирует недостаточные для стабильной работы электрические свойства, включая низкие токи во включенном состоянии и быструю потерю работоспособности [34], поэтому в данной работе концентрация **ВТВТ-биотина** в рецепторном слое ОПТЭЗ без отдельного полупроводникового слоя была снижена до 5 масс.% для стабилизации характеристик устройства, с учетом, что второй компонент этого слоя, **D2-Hept-ВТВТ-Нex**, является хорошим органическим полупроводником, и неоднократно применялся в монослойных органических полевых транзисторах [207,219].

В то же время в работе [34] было показано, что ОПТЭЗ на основе органического полупроводника **С8-ВТВТ-С8** и рецепторного слоя, содержащего 5% **ВТВТ-биотина**, проявляет чувствительность к вирусу гриппа А, однако величина отклика такого устройства ниже, чем аналогичного устройства с рецепторным слоем, содержащим 30% **ВТВТ-биотина**. Нами было выдвинуто предположение, что регулирование толщины слоя органического полупроводника может повысить сенсорную чувствительность ОПТЭЗ, содержащего 5% **ВТВТ-биотина** в составе рецепторного слоя, поэтому такое устройство с 5% **ВТВТ-биотина** в рецепторном слое, не содержащее отдельного слоя органического полупроводника, было изготовлено методом Ленгмюра-Шеффера.

Формирование каждого функционального слоя в составе ОПТЭЗ-устройств контролировали методом АСМ-микроскопии. Морфология поверхности полупроводниковых слоев **C8-BTBT-C8** и **D2-Hept-BTBT-Hex** соответствовала ранее опубликованным литературным данным и представлена на рисунках 34а-б. Морфология поверхности рецепторных слоев для всех изготовленных устройств имела вид, характерный для ЛШ монослоя на основе **D2-Hept-BTBT-Hex**, и практически не зависела от наличия, толщины и химического строения нижележащего слоя органического полупроводника (рисунок 34в-д). Продольные трещины, видимые на рисунке 34в, соответствуют трещинам в слое полупроводника **C8-BTBT-C8**, как это показано на рисунке 34а.

Электрические характеристики всех изготовленных типов ОПТЭЗ до и после нанесения рецепторного слоя были исследованы в капле с использованием зондовой станции или в проточной ячейке, для 20 и 5 отдельных транзисторов, расположенных на одной подложке, соответственно, с целью набора статистики и определения выхода рабочих устройств.

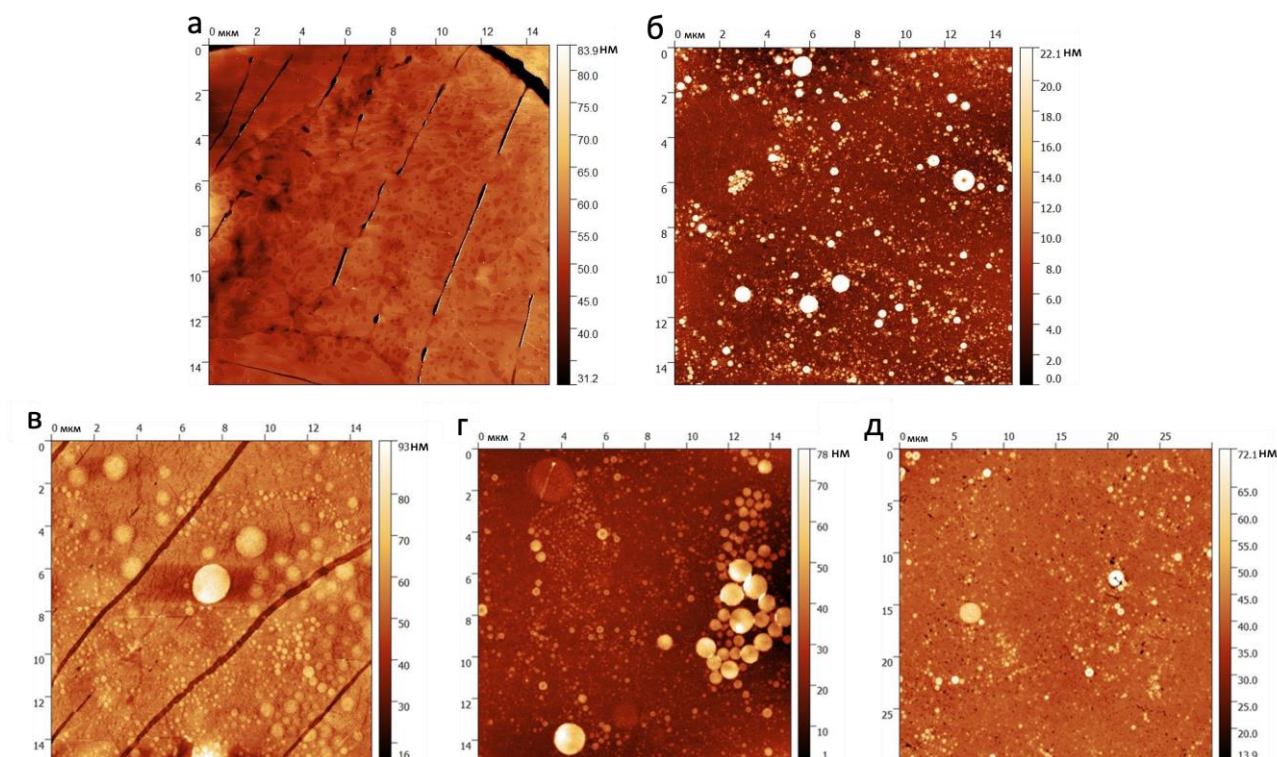


Рисунок 34 – АСМ изображения рецепторных слоев на поверхности ОПТЭЗ, изготовленных с использованием различных полупроводниковых слоев: (а) **C8-BTBT-C8**; (б) **D2-Hept-BTBT-Hex**; (в) 30% BTBT-биотина+70% D2-Hept-BTBT-Hex с подслоем **C8-BTBT-C8** в качестве полупроводника; (г) 30% BTBT-биотина+70% D2-Hept-BTBT-Hex с подслоем **D2-Hept-BTBT-Hex** в качестве полупроводника (д) 5% BTBT-биотина+90% D2-Hept-BTBT-Hex без полупроводника

Все исследованные варианты архитектур ОПТЭЗ с нанесенным рецепторным слоем продемонстрировали хорошие электрические характеристики, включая низкий гистерезис вольтамперных кривых, высокое соотношение токов во включенном и выключенном

состоянии (I_{on}/I_{off}), высокую передаточную проводимость (g_m) и низкие пороговые напряжения (V_{th}). Все ОПТЭЗ показали высокую стабильность электрических параметров во время измерения в деионизированной воде или фосфатном буфере, а также при хранении в нормальной атмосфере при обычном комнатном освещении. Электрические характеристики трех типов исследованных устройств суммированы в Таблице 1 и усреднены по 60 единичным устройствам для каждого типа ОПТЭЗ. В отличие от устройства, не имеющего слоя органического полупроводника, и с рецепторным слоем, содержащим 30 % **ВТВТ-биотина**, устройство без органического полупроводника и с рецепторным слоем, содержащим 5 % **ВТВТ-биотина**, показало корректное для ОПТЭЗ функционирование (данные в Таблице 1 для данного устройства были усреднены по 20 образцам).

Таблица 1 – Электрические параметры биосенсорных ОПТЭЗ-устройств, изготовленных с использованием различных слоев органических полупроводников (усредненные по 60 устройствам).

Устройство	I_{on} , мкА	I_{off} , нА	g_m , $A^{1/2} B^{-1}(\times 10^6)$	V_{th} , мВ	$I_{on/off}$ ($\times 10^3$)
(С8-ВТВТ-С8/ рецепторный слой с 30% ВТВТ-биотина	-0.11 ± 0.02	-0.01 ± 0.004	-3.5 ± 0.5	-215 ± 50	$12,1 \pm 2,9$
D2-Hept-ВТВТ- Hex / рецепторный слой с 30% ВТВТ-биотина	-0.35 ± 0.05	-0.05 ± 0.006	-6.3 ± 0.7	-235 ± 20	$7,0 \pm 0,2$
Рецепторный слой с 5% ВТВТ-биотина (усреднено по 20 устройствам)	-0.10 ± 0.03	-0.01 ± 0.005	-3.4 ± 0.6	-112 ± 20	$11,3 \pm 2,7$

Дальнейшее придание ОПТЭЗ-устройствам биоузнающих свойств было основано на биотин-стрептавидиновом взаимодействии для осуществления которого на поверхность рецепторного слоя ОПТЭЗ иммобилизовали стрептавидин согласно методике, описанной в Экспериментальной части, Раздел 2.5. В качестве узнающего элемента, иммобилизованного

на поверхность ОПТЭЗ за счет связывания со стрептавидином и используемого в дальнейшем для специфического связывания с биоаналитом, был выбран ДНК-аптамер RNA0385. Этот аптамер обладает способностью связывать различные штаммы вируса гриппа А с почти одинаковой аффинностью [222,223], что позволяет обнаруживать независимые штаммы вируса [224].

Изготовленные на основе первого и второго типов ОПТЭЗ устройства с нижним слоем полупроводника различного химического строения и рецепторным слоем, содержащим 30% **ВТВТ-биотина**, показали хорошие электрические свойства и возможность их использования в качестве биосенсоров после функционализации узнающим слоем. Это подтверждается их передаточными характеристиками (рис. 35а,б), демонстрирующими достаточное для использования в биосенсорах отношение токов во включенном и выключенном состоянии (I_{on}/I_{off}) после осаждения всех функциональных слоев биомолекул.

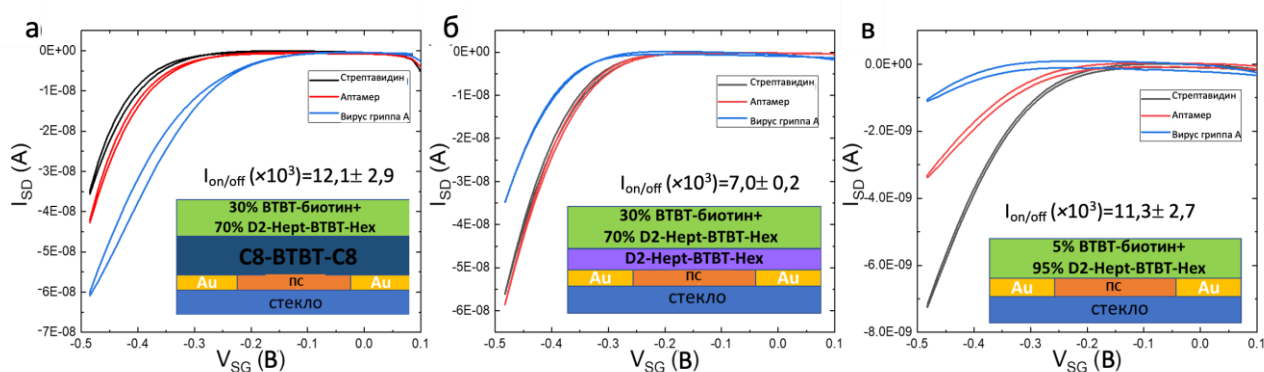


Рисунок 35 – Передаточные характеристики биосенсоров на основе ОПТЭЗ: (а) с полупроводниковым слоем **C8-VTBT-C8**; (б) с полупроводниковым слоем **D2-Hept-VTBT-Hex**; (в) без полупроводникового слоя

Что касается устройства на основе третьего типа ОПТЭЗ (рисунок 35в), то, к сожалению, концепция повышения сенсорной чувствительности за счет уменьшения толщины слоя органического полупроводника по аналогии с тем, как это наблюдалось для газовых сенсоров на основе ОПТ, не сработала. Устройство без полупроводника, содержащее 5 % **ВТВТ-биотина** в рецепторном слое, не продемонстрировало достаточной воспроизводимости свойств, показав значительное ухудшение электрических характеристик после нанесения узнающего функционального слоя. Был сделан вывод о том, что иммобилизация биомолекул, имеющих относительно большие размеры (стрептавидина и аптамера) на тонкий рецепторный слой ухудшает характеристики получающегося ОПТЭЗ-устройства вплоть до невозможности его эксплуатации в качестве сенсорного элемента (рис. 35 в).

Для оценки возможностей количественного определения биоаналита с использованием ОПТЭЗ с двумя различными активными полупроводниковыми слоями были проведены

эксперименты по определению вируса гриппа А в целевом диапазоне концентраций, изменяющихся в пределах пяти порядков, от 10^4 до 10^9 вирусных частиц на мл (ВЧ/мл). Указанный диапазон концентраций соответствует содержанию вируса в плазме крови на различных стадиях вирусного заболевания. Определение проводили следующим образом: вирус гриппа А иммобилизовали на поверхность ОПТЭЗ-биосенсора с узнающим слоем на основе стрептавидина и биотинилированного аптамера по методике, описанной в Главе 2, раздел 5. Было обнаружено, что оба типа ОПТЭЗ-биосенсоров демонстрируют монотонную зависимость величины сенсорного отклика от концентрации вируса в широком диапазоне концентраций (рис. 35а,б). В качестве параметра сенсорного отклика как и в более ранних работах использовали передаточную проводимость устройства без присутствия вируса гриппа А, нормированную на передаточную проводимость устройства в присутствии вируса гриппа А ($g_m(\text{аптамер})/g_m(\text{вирус гриппа А})$).

Все измеренные устройства продемонстрировали воспроизводимые электрические характеристики и очень низкую деградацию в процессе измерений. Предел обнаружения вируса гриппа А был оценен как отклик, в 3 раза превышающий стандартное отклонение, измеренное в эталонном растворе (по результатам 10 повторений), и составил $6,1 \cdot 10^5$ вирусных частиц на мл для ОПТЭЗ-устройств с толстым слоем полупроводника **C8-BTBT-C8** и $6,1 \cdot 10^4$ вирусных частиц на мл для ОПТЭЗ-устройств с тонким слоем полупроводника **D2-Hept-BTBT-Hex**. Сравнивая величины соответствующих сенсорных откликов, можно заметить, что устройство с тонким слоем полупроводника на основе **D2-Hept-BTBT-Hex** имеет почти в 1,5 раза более высокий отклик на вирус гриппа А по сравнению с устройством с толстым слоем полупроводника **C8-BTBT-C8**. Наблюдаемое повышение сенсорной чувствительности для устройства с тонким слоем полупроводника, вероятно, связано с тем, что событие связывания биоаналита с узнающим элементом, изменяющее распределение зарядов в двойном электрическом слое и влияющее таким образом на электрические характеристики ОПТЭЗ, в случае тонкого полупроводника происходит ближе к токонесящему слою, нежели в случае толстого полупроводника.

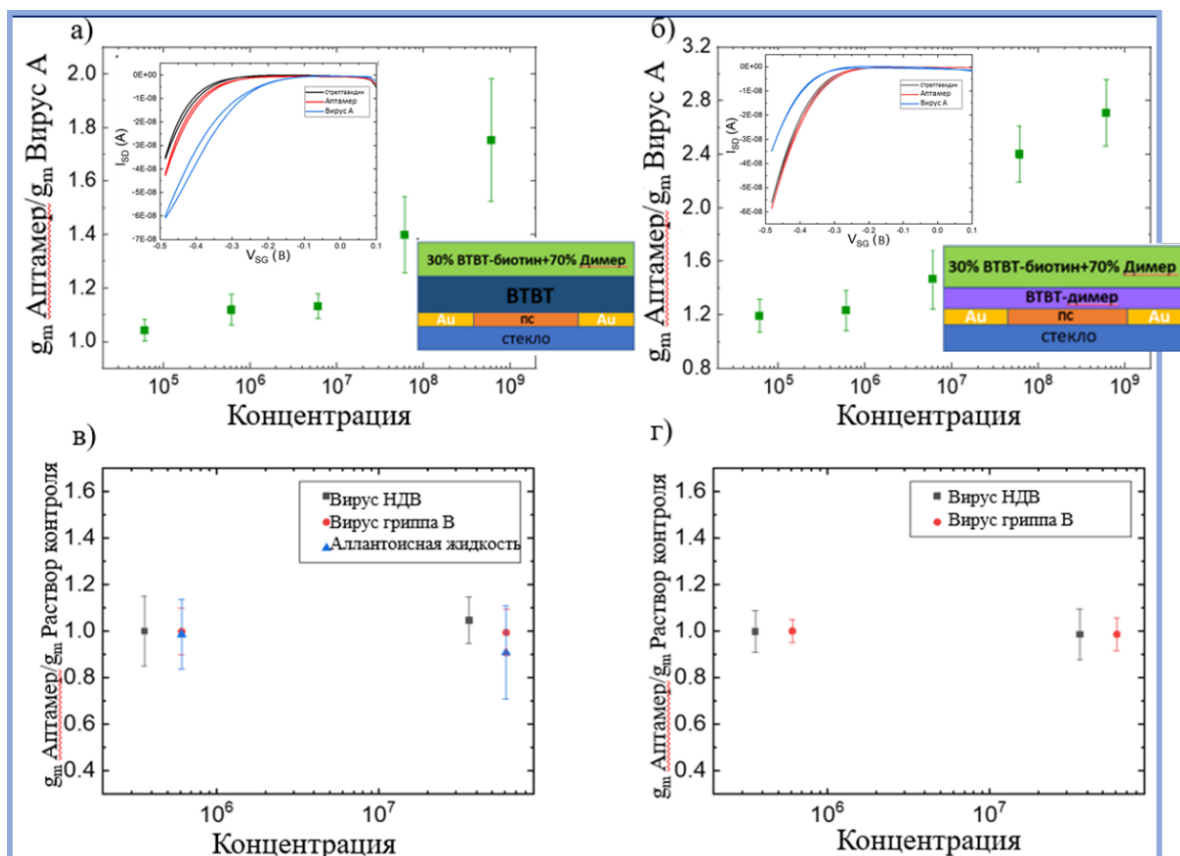


Рисунок 35 – Концентрационные зависимости отклика ОПТЭЗ биосенсоров на вирус гриппа А (а,б) и контрольные вирусы болезни Ньюкасла, гриппа В и аллантоисной жидкости (в,г) для устройств с различными полупроводниками: **C8-VTBT-C8** (а,в) и **D2-Hept-VTBT-Hex** (б,г)

Специфичность отклика изготовленных биосенсоров на целевой анализ в сравнении с неспецифическим связыванием ими различных биомолекул в канале транзистора, приводящим к ложноположительным или ложноотрицательным результатам, определяли проведением нескольких контрольных экспериментов. Для оценки специфичности отклика в качестве контрольных биоаналитов использовали вирусы болезни Ньюкасла и гриппа В, а также безвирусную аллантоисную жидкость, которые иммобилизовали на поверхность ОПТЭЗ-биосенсора с узнающим слоем на основе стрептавидина и биотинилированного аптамера по методике, аналогичной методике регистрации отклика на вирус гриппа А. Было установлено, что все контрольные жидкости не вызывали каких-либо значимых изменений передаточной проводимости ОПТЭЗ в сравнении с изменениями, вызываемыми присутствием целевого вируса гриппа А (рис. 35 в, г). Это означает, что наблюдаемое в присутствии вируса гриппа А увеличение крутизны вольт-амперной характеристики ОПТЭЗ (передаточной проводимости ОПТЭЗ), представляющей собой параметр сенсорного отклика, в исследованном диапазоне концентраций (рис. 35а,б) является результатом высокоспецифичных взаимодействий целевого вируса и узнающей поверхности устройства.

Таким образом, оба ОПТЭЗ-биосенсора показали отличную специфичность при определении вируса гриппа А по сравнению с другими типами вирусов и биологической жидкостью, не содержащей вирусов. Ранее уже было показано, что аптамер RHA0385 обладает высокой специфичностью к вирусу гриппа А в гомогенных жидких средах [224], однако полученные новые результаты указывают на низкий уровень неспецифического связывания и высокий уровень специфического связывания с аптамером, в том числе в случаях гетерогенного взаимодействия, обусловленного размещением аптамера на поверхности ОПТЭЗ. Специфичность была достигнута без использования детергентов и сложных этапов промывки, что упрощает процедуру исследования.

Учитывая достигнутый достаточно низкий предел обнаружения, равный $6,1 \cdot 10^4$ вирусных частиц на мл, небольшое время (порядка 15 минут), необходимое на обнаружение патогена, а также отсутствие необходимости специальной пробоподготовки и простой подход к измерению сенсорного отклика, легко реализуемый в портативном устройстве, разработанный ОПТЭЗ-биосенсор подходит в качестве метода экспресс-обнаружения вирусов во внелабораторных условиях непосредственно в местах оказания медицинской помощи. В настоящее время золотым стандартом экспресс-диагностики вируса гриппа А при оказании медицинской помощи за пределами госпиталя служат тест-полоски для иммунохроматографического анализа на основе антител, имеющие предел обнаружения, равный $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ вирусных частиц на мл, и требующие 10-15 минут на проведение анализа [96]. Разработанный нами ОПТЭЗ-биосенсор имеет как минимум на 1,5 порядка более низкий предел обнаружения при аналогичном времени проведения анализа.

Следует отметить, что наиболее низкий предел обнаружения вируса гриппа А в диапазоне $3 \cdot 10^2$ – $1,2 \cdot 10^3$ вирусных частиц на мл может быть достигнут при использовании полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-тест), однако минимальное время такого анализа составляет 2-3 часа, требуя дорогостоящего оборудования (ПЦР-амплификатора) и высококвалифицированного персонала [95,225]. Петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (RT LAMP) представляет собой промежуточное решение в вирусной диагностике с пределом обнаружения 10^4 вирусных частиц гриппа А на мл и временем анализа около 1 часа [226]. Изготовленный нами биосенсор в 4 раза менее затратен по времени и имеет достаточный предел обнаружения вирусных частиц для практического применения, поскольку типичная вирусная нагрузка в биологических образцах человека, например, в назальных мазках, находится в диапазоне 10^5 - 10^8 геномов гриппа А на мл [227], что эквивалентно 10^5 - 10^8 вирусных частиц гриппа А на мл. Именно этот диапазон концентраций вируса полностью охватывается изготовленным ОПТЭЗ-аптасенсором (Рисунок 35).

Таким образом, в результате проведенных исследований был разработан подход, позволивший достичь не только быстрой специфической детекции вирусных частиц, но и возможности их количественного определения с использованием аптасенсора на базе ОПТЭЗ, что было продемонстрировано на примере вируса гриппа А. Высокая чувствительность и селективность изготовленных устройств была доказана на примере вируса гриппа А, а также контрольных биожидкостей, таких как вирус гриппа В, вирус болезни Ньюкасла и аллантоисная жидкость с различными разведениями. Порог обнаружения вируса гриппа А составил до $6,1 \cdot 10^5$ вирусных частиц на мл для первого типа устройства с толстым слоем полупроводника **C8-BTBT-C8** и $6,1 \cdot 10^4$ вирусных частиц на мл для второго типа устройства с тонким слоем полупроводника **D2-Hept-BTBT-Hex**. Было исследовано влияние толщины полупроводникового слоя на сенсорные свойства ОПТЭЗ и установлено, что устройство на основе одного биотинилированного рецепторного слоя без нижележащего слоя полупроводника демонстрирует чувствительность к вирусу гриппа А, однако результаты плохо воспроизводятся, в то время как ОПТЭЗ-устройства как толстым, так и с тонким активными полупроводниковыми слоями и биотинилированным рецепторным слоем демонстрируют высокую чувствительность к вирусу гриппа А. Более тонкий органический полупроводниковый подслой в ОПТЭЗ обеспечивает более интенсивный (в 1,5 раза выше) отклик на вирус и на порядок величины большую чувствительность.

3.1.2. Влияние метода формирования рецепторного слоя на сенсорные свойства ОПТЭЗ-устройств

Еще одной задачей данного раздела являлось определение влияния метода формирования рецепторного слоя на сенсорные свойства ОПТЭЗ-устройств [150]. Биосенсоры на основе ОПТЭЗ имеют сложную многослойную структуру и в процессе создания проходят многостадийный путь формирования каждого из функциональных слоев. Функционализация поверхности полупроводника биомолекулами представляет собой достаточно сложную материаловедческую задачу, требуя при этом использования универсальных подходов, позволяющих изготавливать мультисенсорные устройства на одном чипе. Таким образом, поиск простых и технологичных подходов к функционализации поверхности органического полупроводника представляет собой актуальный вопрос.

Потенциальным решением этой задачи является использование высокоэффективных и селективных реакций, позволяющих создавать разнообразные молекулярные структуры в мягких условиях с использованием доступных исходных веществ [228]. Наиболее распространенной такой реакцией является азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC),

катализируемое Cu (I), часто называемое также «клик»-реакцией [147]. Продукты данной реакции стабильны в широком спектре растворителей и не вступают в реакции с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами, что подтверждает их биосовместимость [229]. «Клик»-реакция, катализируемая Cu (I), не требует защиты каких-либо функциональных групп, протекает практически с полной конверсией, а сам медный катализатор не только ускоряет реакцию, но и регулирует взаимодействие реагирующих групп, что приводит к региоселективному образованию только 1,4-дизамещенного 1,2,3-триазола [230]. Благодаря этим преимуществам, реакции азид-алкинового циклоприсоединения всё чаще применяют для разработки электрохимических устройств [175]. Несмотря на все вышеперечисленные достоинства, примеров использования «клик»-реакций для функционализации биомолекулами органических полупроводников и изготовления биосенсорных устройств достаточно мало, и все они посвящены устройствам на основе органических электрохимических транзисторов.

Нами была предпринята попытка применить методы «клик»-химии, а именно реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемую Cu (I), для формирования биотинсодержащего рецепторного слоя непосредственно на поверхности полупроводникового слоя **C8-BTBT-C8**, ранее уже использованного в качестве основы ОПТЭЗ-биосенсора для обнаружения вируса гриппа А. Использование предложенного подхода позволяет избавиться от одной из стадий формирования узнающего слоя, а именно переноса биотинилированного производного BTBT – **BTBT-биотина** на поверхность органического полупроводника с использованием метода Ленгмюра-Шеффера, который, во-первых, требует специального оборудования (ванны Ленгмюра), а во-вторых, недостаточно технологичен для переноса в промышленное производство. В то же время реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая Cu (I), имеет простой механизм, при котором катализатор активирует алкиновые фрагменты, облегчая реакцию алкин-азидной циклизации и приводя к быстрому, эффективному, селективному взаимодействию, способному протекать при комнатной температуре.

Для реализации предложенного подхода было использовано новое производное [1]бензотиено[3,2-b][1]бензотиофена с алкиновой функциональной группой на конце (**BTBT-alkyne**), которое было синтезировано и полностью охарактеризовано в лаборатории функциональных материалов для органической электроники и фотоники ИСПМ РАН, (структурная формула приведена на Рисунке 1). Это соединение было использовано для создания основы для дальнейшей клик-реакции на поверхности ОПТЭЗ. Присутствие в химической структуре **BTBT-alkyne** сопряженного фрагмента бензотиенобензотиофена позволяет ожидать, что синтезированное соединение будет способно к сокристаллизации с

Согласно вышеприведенной логике, **ВТВТ-alkyne** был использован в смеси с **С8-ВТВТ-С8** и полистиролом (ПС) для изготовления токонесущего слоя ОПТЭЗ методом дозирующего лезвия по ранее разработанной методике использования смесей **С8-ВТВТ-С8/ПС** [211]. Затем алкиновые функциональные группы на поверхности полупроводникового слоя были задействованы в «клик»-реакции азид-алкинового циклоприсоединения с биотинилированным азидом, позволив сформировать биотин-содержащий рецепторный слой непосредственно на поверхности ОПТЭЗ (Рисунок 36). Последующая модификация биотиновых фрагментов стрептавидином и ДНК-аптамером в качестве узнающего элемента позволила создать биосенсор для определения вируса гриппа А.

Electrochemical synthesis of a biotin-modified electrode. The diagram illustrates the reaction of an alkyne-functionalized electrode (left) with a biotin-alkyne reagent (right) in the presence of 50% DMSO/Cu (I) to form a triazole linkage. The electrode structure consists of layers: Electrolyte, C8-BTBT-C8/BTBT-alkyne, Polystyrene, and Glass, with Au (C) and Au (M) contacts. The reaction conditions are 50% DMSO/Cu (I). The chemical structures of R¹ and R² are shown below the reaction scheme.

Chemical structures of R¹ and R²:

R¹ = CCCCCCCCCOCCCCCCCCCc1ccc2c(c1)sc3cc(ccc3s2)CCCC(C)C

R² = CCCCCCCCC(=O)N1C(=O)N(CS1)CCCCCCCCC(=O)N

89

Подтверждением того, что в результате проведенной реакции произошло «прикликивание» молекулы биотина на поверхность полупроводника, является изменение контактного угла смачивания поверхности (КУС) (рисунок 37). Измеренные значения КУС до проведения «клик»-реакции практически не менялись при увеличении содержания алкинильной компоненты в слое полупроводника, однако после проведения «клик»-реакции наблюдалось уменьшение контактного угла смачивания по мере возрастания содержания **ВТВТ-alkyne** в полупроводниковой пленке, что связано с появлением на поверхности полупроводника биотина, увеличивающего ее гидрофильность. Для 10 и 20%-го содержания ВТВТ-alkyne в полупроводниковой пленке значение КУС совпадает в пределах погрешности измерения. Это свидетельствует о том, что максимальное заполнение поверхности биотином достигается уже при 10%-м содержании алкинной компоненты в слое и далее не может быть увеличено, вероятно из-за стерических затруднений.

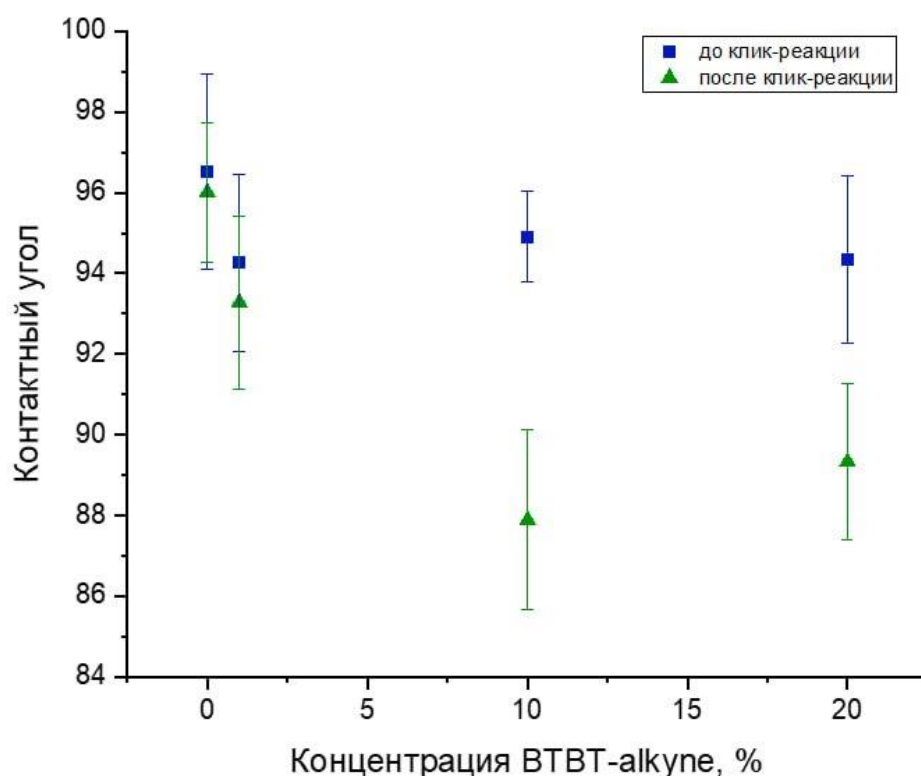


Рисунок 37 – Контактный угол смачивания деионизованной водой, измеренный на поверхности ОПТЭЗ до и после проведения «клик» реакции

Морфология формирующихся поверхностей ОПТЭЗ-устройств была исследована методом атомно-силовой микроскопии на каждом этапе изготовления биосенсора (рисунок 38). Обнаружено, что после проведения «клик»-реакции увеличивается шероховатость слоя (обозначена RMS на рисунке 38), причем для пленок, исходно содержащих 10 и 20% алкинной компоненты (рисунок 38 в, г, ж, з), изменение шероховатости более выражено по сравнению с пленками, исходно содержащими 0% и 1% алкинной компоненты (рисунок 38 а, б, д, е). Данная тенденция объясняется протеканием «клик»-реакции на поверхности

полупроводникового слоя ОПТЭЗ и также косвенно подтверждает появление биотиновых фрагментов, увеличивающих шероховатость поверхности.

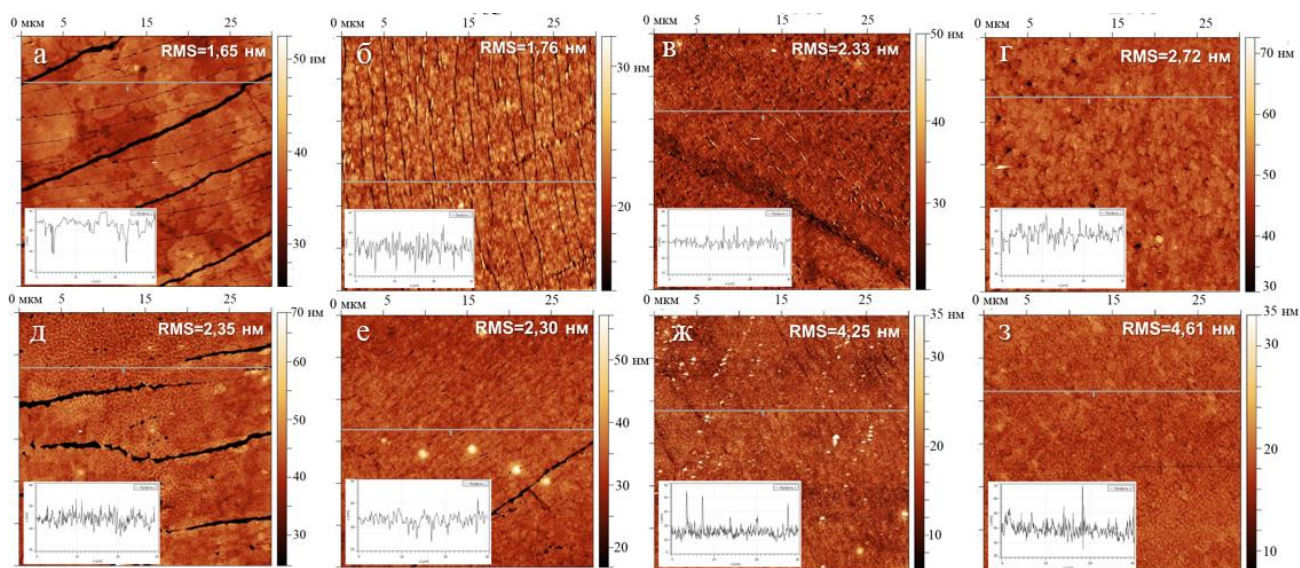


Рисунок 38 – АСМ-изображения морфологии поверхности ОПТЭЗ до (а-г) и после (д-з) «клик» реакции для слоев с различным содержанием алкильной компоненты (а, д) 0% C11-BTBT-C6-O-C3, (б, е) 1% C11-BTBT-C6-O-C3, (в, ж) 10% C11-BTBT-C6-O-C3, (г, з) 20% C11-BTBT-C6-O-C3

Сохранение полевого эффекта как до, так и после «клик»-реакции подтверждается выходными характеристиками ОПТЭЗ в диапазоне рабочих напряжений V_{GS} от -0,1 В до -0,5 В для всех изготовленных устройств с содержанием алкильной компоненты в слое полупроводника 0%, 1%, 10%, 20%. Содержание алкина в слое полупроводника, равное 1%, является недостаточным для дальнейшего исследования сенсорных свойств биосенсора, в то время как добавление алкина в концентрации 20 масс% оказывает негативное влияние на морфологию поверхности полупроводника. Измерения вольт-амперных характеристик проводили как в воде, так и в растворе электролита с высокой ионной силой (0.1 М водный раствор NaCl) (рисунок 39).

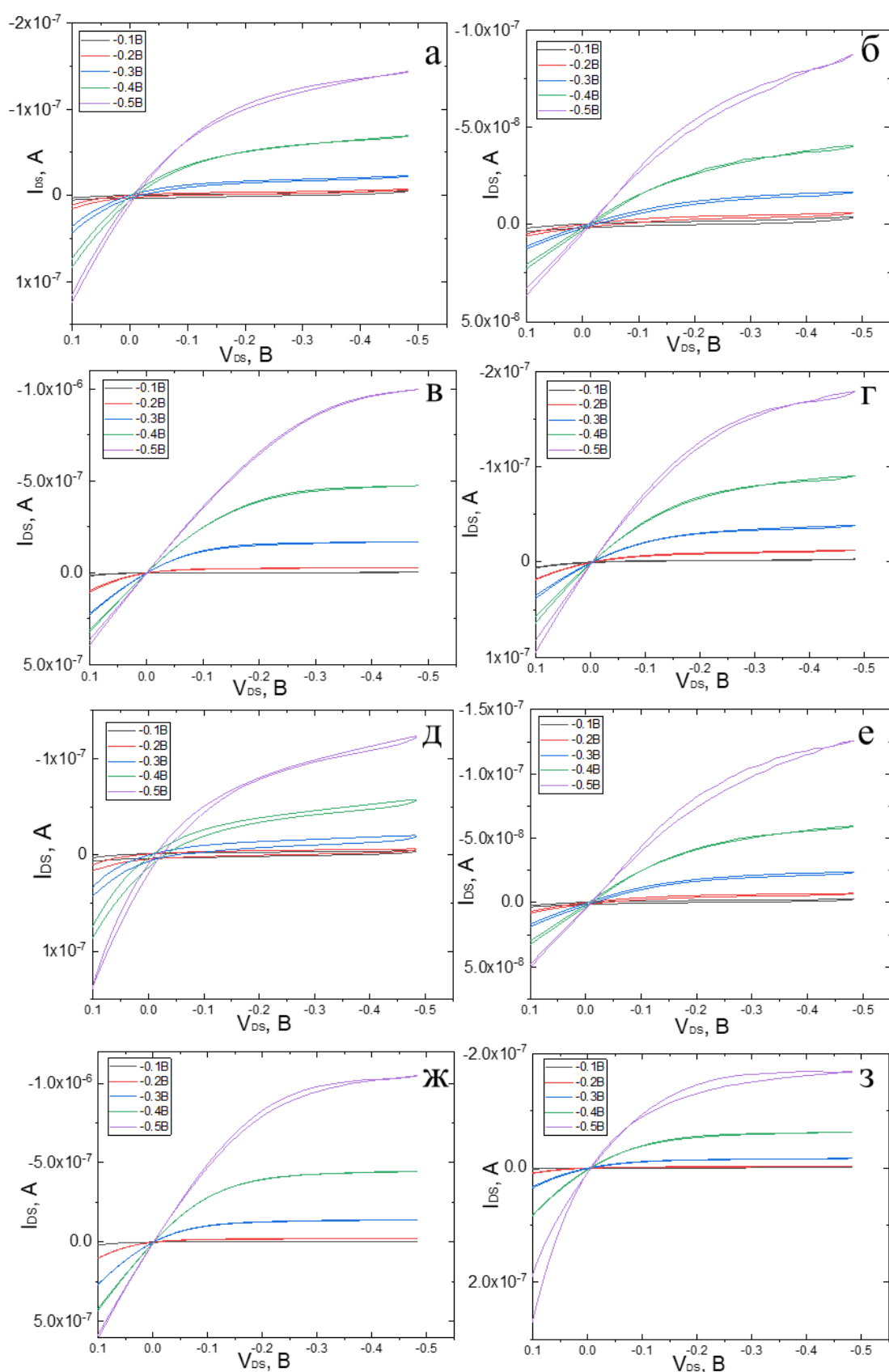


Рисунок 39 – Выходные характеристики ОПТЭЗ с водным (а-г) и солевым (д-з) электролитом: (а, д) 0% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции, (б, е) 0% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции, (в, ж) 10% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции, (г, з) 10% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции

В таблице 2 приведено сравнение передаточных характеристик изготовленных ОПТЭЗ-устройств с содержанием **ВТВТ-alkyne** от 0% до 20%. В ряду устройств 0-1-10-20% **ВТВТ-alkyne** наблюдается закономерное уменьшение токов во включенном состоянии (I_{on}), обусловленное возрастанием числа зарядовых ловушек в полупроводниковом слое в связи с увеличением содержания алкинильной компоненты, содержащей кислород, а также $C\equiv C$ -группу в своем составе, однако I_{on} опускается не ниже 0,56 мкА. После проведения «клик»-реакции I_{on} уменьшаются на порядок для всех составов полупроводникового слоя, что связано с биотинилированием поверхности, а также, возможно, с негативным воздействием двухчасового выдерживания в растворе ДМСО-вода при проведении «клик»-реакции. Несмотря на это, соотношение токов во включенном и выключенном состоянии $I_{on/off}$ оказалось не ниже уровня, допустимого для биосенсоров на основе ОПТЭЗ, для устройств, содержащих 10 и 20% **ВТВТ-alkyne** (параметр $I_{on/off}$ больше 10^2), тогда как устройства, содержащие 0% и 1% **ВТВТ-alkyne**, ухудшили свои характеристики после «клик»-реакции до состояния, неприемлемого для применения в биосенсорах. Типичные передаточные кривые для ОПТЭЗ, содержащих 10% алкинового производного **ВТВТ-alkyne** в слое полупроводника и не содержащих **ВТВТ-alkyne**, до и после «клик»-реакции представлены на рисунке 40.

Таблица 2 – Электрические характеристики ОПТЭЗ-устройств с содержанием **ВТВТ-alkyne** от 0% до 20%.

ОПТЭЗ-устройство	I_{on} , мкА	I_{off} , нА	$g_m A^{1/2} B^1 (\times 10^4)$	V_{th} , В	$I_{on/off}$
0% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции	16±3	8±3	-59±14	0.1±0.03	2000±600
0% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции	0.6±0.2	8±2	-18±3	-0.07±0.06	70±20
1% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции	2.7±0.6	3±0.3	-40±4	-0.08±0.006	1000±120
1% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции	0.12±0.02	2±0.6	-6±3	-0.07±0.04	60±13
10% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции	0.9±0.4	2±0.2	-20±5	-0.02±0.005	500±160
10% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции	0.09±0.05	0.4±0.1	-7±2	-0.02±0.006	300±100
20% C11–ВТВТ–С6–О–С3 до «клик»-реакции	0.6±0.3	2±0.6	-18±4	-0.08±0.01	300±100
20% C11–ВТВТ–С6–О–С3 после «клик»-реакции	0.03±0.01	0.15±0.04	-3.3±0.9	-0.03±0.05	210±100

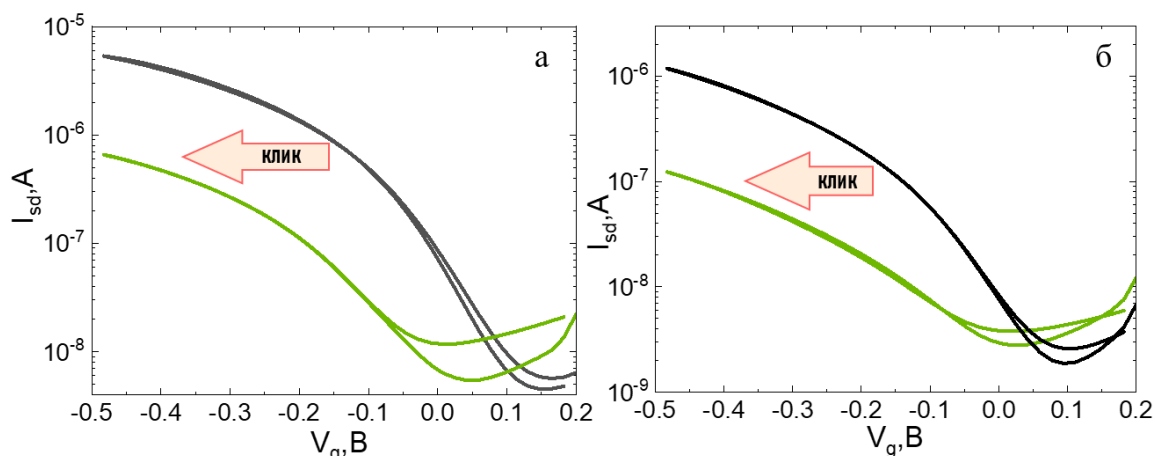


Рисунок 40 – Передаточные характеристики ОПТЭЗ с разным содержанием **BTBT-alkyne**: (а) 0% C11-BTBT-C6-O-C3, (б) 10% C11-BTBT-C6-O-C3. до и после «клик»-реакции

Анализ морфологии и электрических характеристик тонких пленок с различным содержанием **BTBT-alkyne** позволил определить оптимальный состав полупроводникового слоя. Так, содержание **BTBT-alkyne** в слое полупроводника, равное 1%, является недостаточным для дальнейшего исследования сенсорных свойств из-за ухудшения электрических характеристик ОПТЭЗ после «клик»-реакции, тогда как увеличение содержания **BTBT-alkyne** до 20 масс% оказывает негативное влияние на морфологию поверхности полупроводника, повышая ее шероховатость, что негативно влияет на стабильность работы устройства. Таким образом, оптимальное содержание BTBT-alkyne в составе ОПТЭЗ для изготовления на их основе биосенсоров составляет 10 масс%, что и было доказано в дальнейшем эксперименте.

Для подтверждения работоспособности изготовленных ОПТЭЗ-биосенсоров на поверхности устройств было реализовано биотин-стрептавидиновое взаимодействие. Для этого поверхность канала транзистора последовательно функционализировали стрептавидином, затем биотинилированным ДНК-аптамером и далее инаktivированными специфическим вирусом гриппа А или неспецифическим к данному аптамеру вирусом болезни Ньюкасла в концентрации 6×10^6 ВЧ/мл. После каждого этапа устройство промывали фосфатным буферным раствором и деионизированной водой для удаления несвязанных молекул (рисунок 41).

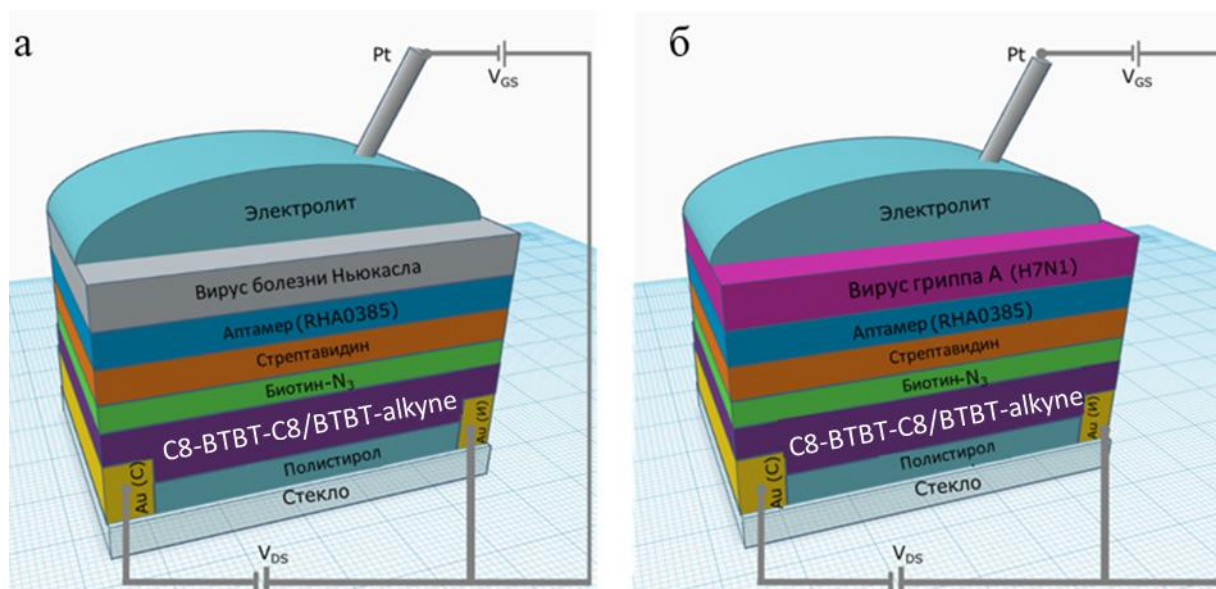


Рисунок 41 –Архитектура ОПТЭЗ-устройства после последовательного инкубирования стрептавидина, аптамера, (а) вируса болезни Ньюкасла или (б) вируса гриппа А (штамм H7N1)

Наиболее информативным параметром сенсорного отклика изготовленных ОПТЭЗ-биосенсоров оказалось пороговое напряжение V_{th} , как и в случае с ранее разработанным рецепторным слоем, изготовленным методом Ленгмюра-Шеффера [34]. На рисунке 42 приведены данные по специфическому отклику устройства, который определяли по смещению порогового напряжения. Наибольшее смещение порогового напряжения после инкубации вируса гриппа А по отношению к аптамеру наблюдается в случае рецепторного слоя с 10% содержанием **BTBT-alkyne** (рисунок 42,в). При содержании **BTBT-alkyne**, равном 1%, в полупроводниковом слое наблюдается незначительное смещение порогового напряжения (рисунок 42,б), поскольку концентрации биотина на поверхности недостаточно для появления значимого отклика. Добавление **BTBT-alkyne** в количестве 20% оказывает негативное влияние на морфологию полупроводниковой поверхности, что приводит к большому разбросу измеренных значений откликов (рисунок 42,г). Для исключения неспецифического связывания, которое могло бы привести к ряду ложноположительных или ложноотрицательных результатов, была проведена серия контрольных измерений с использованием вируса болезни Ньюкасла на устройствах с содержанием **BTBT-alkyne**, равным 1, 10 и 20% (рисунок 42,б-г), а также на устройствах, где в слое полупроводника отсутствовала добавка **BTBT-alkyne** (рисунок 42,а), а следовательно, и биотин на поверхности. Во всех случаях контрольных экспериментов не наблюдалось существенного изменения порогового напряжения после шага, подразумевающего иммобилизацию вируса на слой аптамера.

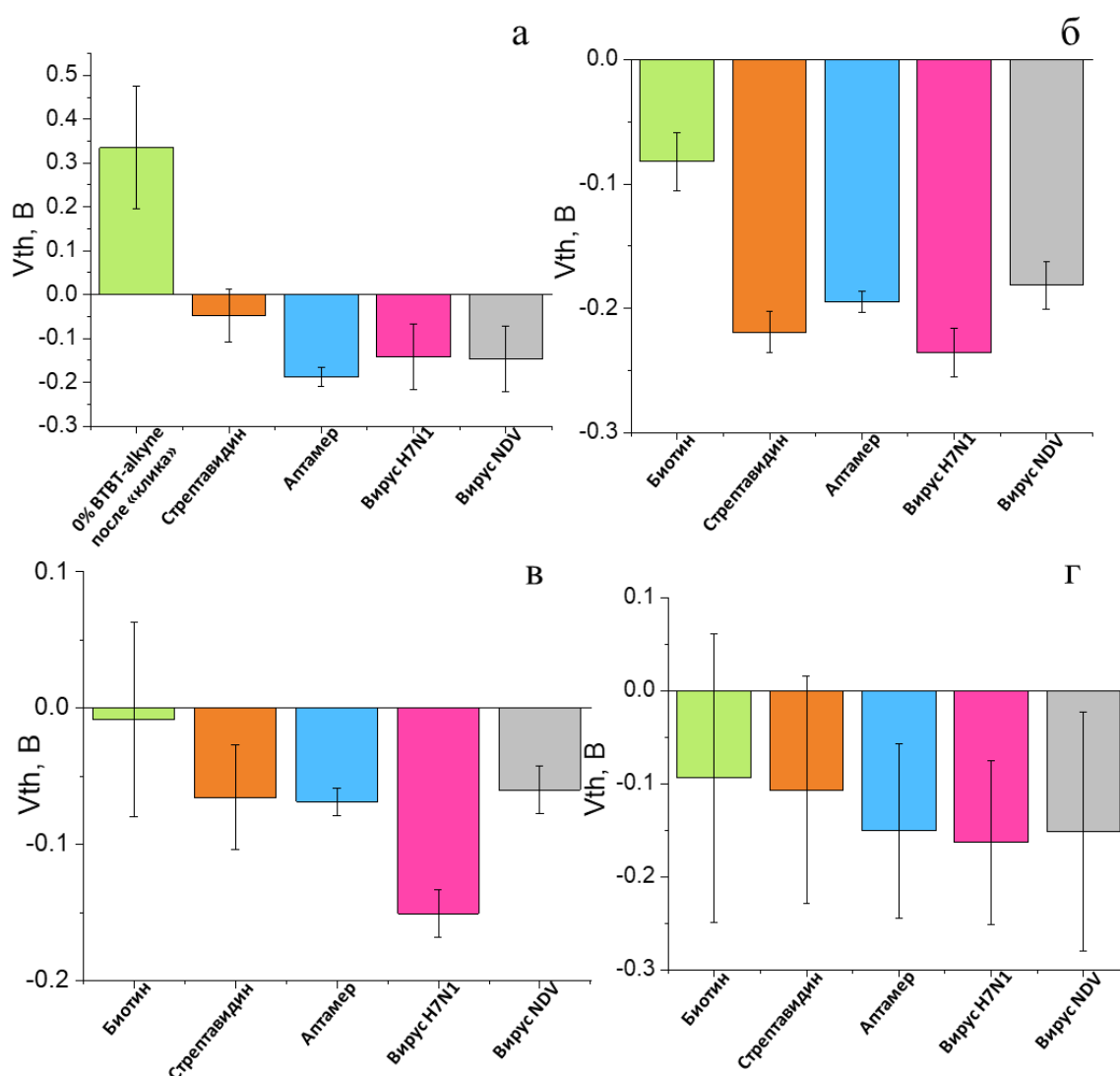


Рисунок 42 –Отклик ОПТЭЗ на целевой анализ (вирус гриппа А) и контрольные измерения вируса болезни Ньюкасла при (а) 0% (б) 1%, (в) 10%, (г) 20% содержания **BTBT-alkyne**

Таким образом, в результате выполненных работ был разработан технологически простой и эффективный подход к созданию рецепторных слоев ОПТЭЗ с использованием методов клик-химии. С использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения, протекающей по «клик»-механизму, был изготовлен и охарактеризован рецепторный слой на поверхности ОПТЭЗ. Определено влияние содержания алкин-содержащей компоненты в составе органического полупроводника на морфологию и функциональность полученного рецепторного слоя, показано, что оптимальным является содержание алкин-содержащей компоненты, равное 10 мас. %. Последующая модификация биотиновых фрагментов стрептавидином и ДНК-аптамером в качестве узнающего элемента позволила создать биосенсор, обнаруживающий вирус гриппа А в концентрации 6×10^6 вир.частиц/мл, что соответствует чувствительности ИХА тест-полосок на основе антител.

Разработанный подход является универсальным и открывает путь к определению широкого спектра аналитов путем использования других ДНК-аптамеров, селективно

связывающихся с различными патогенами. Преимущество предложенного подхода к изготовлению биорецепторного слоя перед описанными ранее методами заключается в том, что данный подход упрощает технологию изготовления ОПТЭЗ-биосенсоров и обеспечивает сокращение расстояния между токонесущим слоем и аналитом, что критически важно для обеспечения высокой чувствительности. Это открывает широкие возможности оптимизации производства ОПТЭЗ-биосенсоров за счет сокращения числа функциональных слоев биосенсора путем использования других функционализированных узнающих элементов (например, азид-производных аптамеров, антител и т.д.) и методов клик-химии для создания узнающих слоев.

3.1.3. Влияние химического строения ВТВТ-содержащих сополимеров на формирование рецепторного слоя ОПТЭЗ-устройств

Еще одним подходом к формированию рецепторного слоя ОПТЭЗ является использование в качестве функциональных материалов для данного слоя сополимеров, имеющих в своем составе как звенья, содержащие ВТВТ-фрагменты, отвечающие за полупроводниковые свойства, так и звенья, содержащие биотиновые фрагменты, отвечающие за дальнейшее формирование узнающих слоев путем биотин-стрептавидинового взаимодействия. В качестве таких сополимеров были выбраны статистические силоксановые гребнеобразные сополимеры различного состава, содержащие в своем составе боковые группы 2-ундецил-7-гексилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена, а также боковые группы биотинзамещенного 2-ундецил-7-гексилбензотиено[3,2-b][1]бензотиофена, структурная формула которых приведена на рисунке 1. Были исследованы сополимеры, содержащие в своем составе 25%, 35% и 50% биотин-содержащих фрагментов, а также в качестве контроля сополимеры, не содержащие биотиновых фрагментов.

Выбор вышеупомянутой химической структуры был обусловлен тем, что основная силоксановая полимерная цепь является очень гибкой и способна формировать на поверхности воды ленгмюровские слои за счет водородных связей между водой и силоксановыми группами, при этом ВТВТ-содержащие фрагменты способны упорядочиваться и кристаллизоваться в образовавшейся пленке, формируя стабильный монослой, который в дальнейшем может быть перенесен на полупроводниковую поверхность ОПТЭЗ методом Ленгмюра-Шеффера. В отличие от низкомолекулярных смесей, использованных для формирования рецепторного слоя ОПТЭЗ, как это описано в Разделе 3.1.1, применение полимерного материала должно повысить стабильность рецепторного слоя

как во время проведения измерений, так и при хранении, препятствуя микросегрегации биотинсодержащих фрагментов в составе слоя.

Поскольку тонкие пленки исследуемых сополимеров планировалось использовать в качестве рецепторных слоев в ОПТЭЗ-биосенсорах [30], в первую очередь было проведено исследование их способности к самоорганизации на поверхности воды и твердых подложек. Было обнаружено, что все исследуемые сополимеры образуют на поверхности воды устойчивые Ленгмюровские слои (Рисунок 43), которые могут быть перенесены при помощи метода Ленгмюра-Шеффера (ЛШ) как на диэлектрический слой из полистирола (ПС), так и на активный полупроводниковый слой ОПТЭЗ, полученный методом дозирующего лезвия из смеси полистирола и **C8-BTBT-C8**.

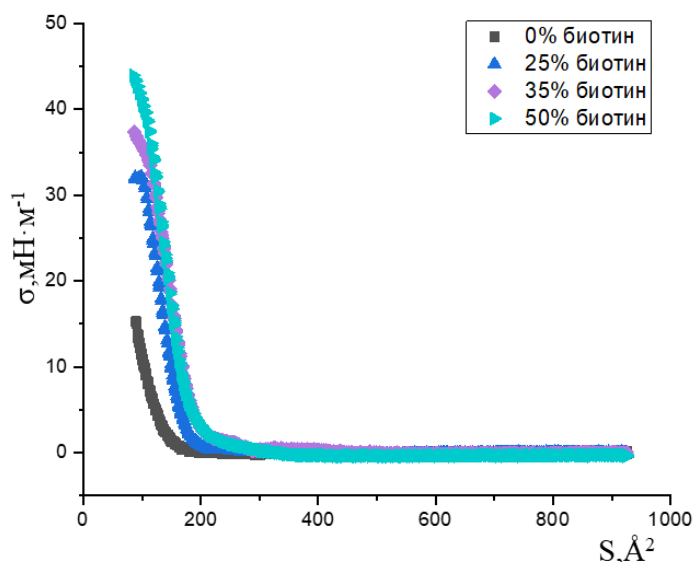


Рисунок 43 – Изотермы Ленгмюра силиконовых сополимеров с различным содержанием биотиновых концевых фрагментов, полученные на поверхности воды из растворов в толуоле с концентрацией 0.33 мг/мл

Анализ площади, приходящейся на одно мономерное звено в ленгмюровском слое, показал, что в пределах ошибки измерений сополимеры различных составов не отличаются друг от друга, при этом площадь на мономерное звено для сополимера, не содержащего биотиновых фрагментов, оказалась на 10% меньше, чем для сополимеров с биотиновыми звеньями в составе. Величина площади, приходящейся на мономерное звено, в среднем составила ≈ 200 Å², что существенно превышает теоретически рассчитанную величину (≈ 10 Å²). При этом в области, соответствующей 150-200 Å² на мономерное звено, на изотермах Ленгмюра наблюдается резкий рост поверхностного давления при незначительном изменении площади. Это свидетельствует о формировании упорядоченного монослоя на поверхности воды, вероятно, за счет самопроизвольной кристаллизации боковых звеньев, происходящей не

в процессе сжатия ленгмюровского слоя, а сразу после нанесения вещества на поверхность воды и испарения растворителя. В этом случае разница в площадях, приходящихся на мономерное звено, для сополимеров, содержащих биотиновые фрагменты, и сополимера, не содержащего их в своем составе, не несет аналитического значения и связана, вероятно, со скоростью кристаллизации материала на поверхности воды.

Морфология и структура перенесенных на подложки ЛШ слоев была исследована методами поляризационно-оптической и атомно-силовой микроскопии, а также измерением краевого угла смачивания (Рисунки 44 и 45). Полученные данные подтверждают предположения, сделанные на основе анализа изотерм Ленгмюра: из оптических микрофотографий и АСМ-изображений видно, что ЛШ слой не закрывает полностью подложку, а переносится в виде «паутинки». Толщина слоя составила порядка 3,5 нм для сополимера без биотиновых фрагментов и 5 нм для сополимеров с биотиновыми фрагментами, что хорошо коррелирует с теоретически рассчитанными длинами боковых групп и подтверждает формирование на поверхности воды монослоя, затем перенесенного на поверхность твердой подложки.

Обнаружено, что морфология ЛШ слоев, а также измеренные величины краевых углов смачивания в пределах ошибки измерений не зависят от содержания биотинового фрагмента в составе сополимера и практически не отличаются при переносе на поверхность полистирола и на поверхность слоя, полученного из смеси **ПС/С8-ВТВТ-С8**. На представленных АСМ-изображениях во всех случаях отчетливо видна типичная морфология нижнего аморфного диэлектрического слоя полистирола (рисунок 44, д-з) или кристаллического полупроводникового слоя **С8-ВТВТ-С8** (рисунок 44, н-р), поверх которых перенесен ЛШ монослой исследуемого сополимера. В случае сополимера, не содержащего биотиновых фрагментов (рисунок 44, д,н), его морфология типична для ЛШ монослоев низкомолекулярных силоксановых димеров алкилпроизводных ВТВТ, представленных на рисунке 34, тогда как в случае биотин-содержащих сополимеров (рисунок 44, д-ж, н-п) полислоевые агрегаты округлой формы, типичные для ЛШ-слоев силоксановых димеров ВТВТ исчезают, а ЛШ-слой имеет равномерную паутинчатую морфологию с небольшой степенью заполнения поверхности.

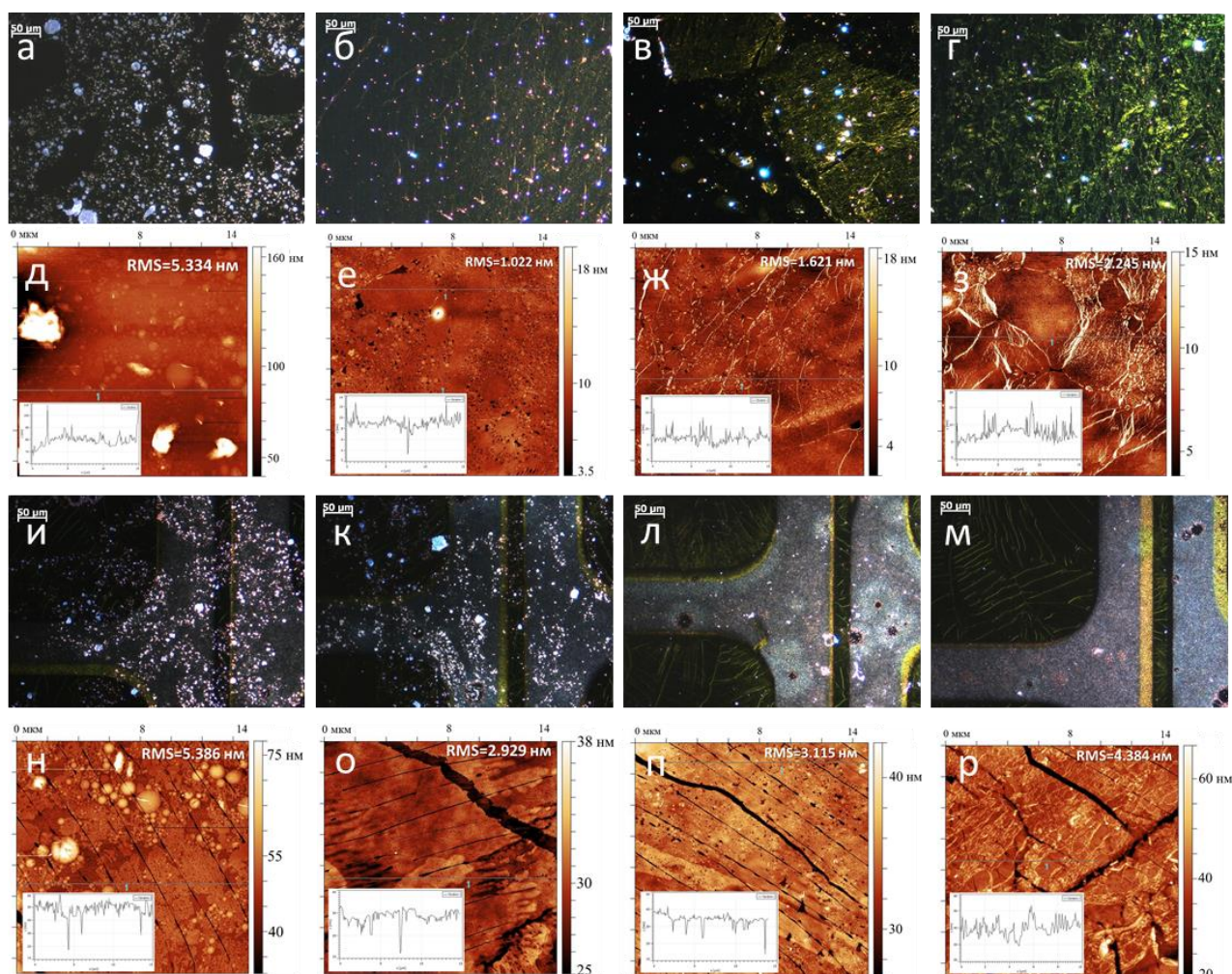


Рисунок 44 – Поляризационно-оптические и АСМ-изображения морфологии поверхности ЛШ слоев сополимеров, перенесенных на слой полистирола (а-з) и на слой из смеси ПС/С8-ВТВТ-С8 (и-з) с различным содержанием биотина, входящего в состав сополимера: (а, д, и, к) 0% биотина, (б, е, к, о) 25% биотина, (в, ж, л, п) 35% биотина, (г, з, м, р) 50% биотина

Сравнение краевых углов смачивания Рисунок 45), измеренных для ЛШ слоев исследуемых сополимеров, а также для слоев полистирола (ПС), полидиметилсилоксана (ПДМС), С8-ВТВТ-С8 и ранее изученных рецепторных ЛШ слоев с биотином на поверхности (ВТВТ-биотин), описанных в работе [34], позволяет предположить, что из-за неполного заполнения поверхности подложки ЛШ-слоем сополимера, измеренный краевой угол в большей степени отражает состояние подложки, содержащей полистирол на поверхности, а не перенесенного на нее ЛШ-слоя.

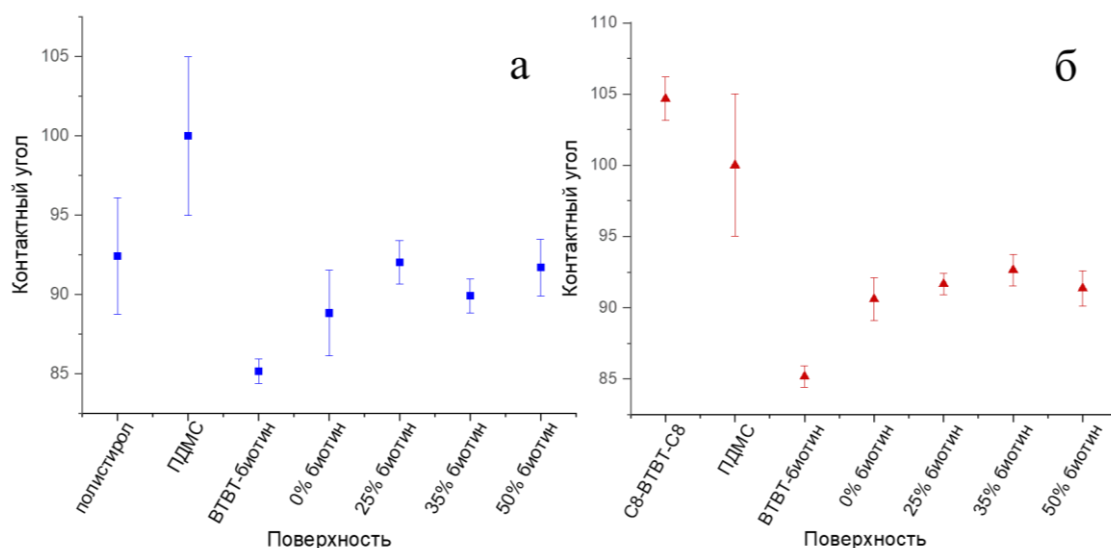


Рисунок 45 – Контактный угол смачивания деионизованной водой, измеренный на поверхности ЛШ слоев сополимеров, перенесенных на слой **ПС** (а) и на слой из смеси **ПС/С8-VTBT-C8** (б) в сравнении со слоями **ПС**, **ПДМС**, **С8-VTBT-C8** и ранее изученных рецепторных ЛШ слоев с биотином на поверхности (**VTBT-биотин**)

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что все исследованные сополимеры образуют на поверхности воды кристаллический монослой, который может быть перенесен методом ЛШ на твердую подложку. Ленгмюровский слой самопроизвольно кристаллизуется на поверхности воды раньше, чем оказывается плотно сжат, поэтому на поверхности **ПС** и смеси **ПС/VTBT** имеет неоднородную структуру с неполным заполнением поверхности и отчетливо выраженными разрывами вне зависимости от содержания биотиновых фрагментов в составе сополимера.

Следует отметить, что перенос ЛШ слоя исследуемых сополимеров не оказывал негативного влияния на электрические свойства ОПТЭЗ с полупроводниковым слоем на основе смеси **ПС/С8-VTBT-C8**, для всех составов сополимеров были получены вольтамперные кривые, типичные для электролитических транзисторов р-типа (рисунок 46). В то же время следующий шаг по созданию узнающего слоя для ОПТЭЗ-биосенсора, связанный с иммобилизацией стрептавидина на поверхность ОПТЭЗ за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия, оказался менее успешным. Данные Рамановской спектроскопии (рисунок 47) не подтвердили появление стрептавидина на поверхности ЛШ слоев ни для одного из исследованных сополимеров. Сравнение электрических характеристик трех изготовленных в аналогичных условиях подложек ОПТЭЗ с ЛШ слоем из сополимера, содержащего 50% биотиновых фрагментов, каждая подложка по 5 единичных транзисторов (пикселей), до и после иммобилизации стрептавидина, показало, что только малое количество пикселей (6 из 13 работающих) продемонстрировало изменение порогового напряжения после иммобилизации стрептавидина (Рисунок 48). При этом ранее полученные данные

подтверждают, что выбор порогового напряжения в качестве параметра сенсорного отклика для ОПТЭЗ является адекватным на стадии иммобилизации стрептавида на рецепторный слой.

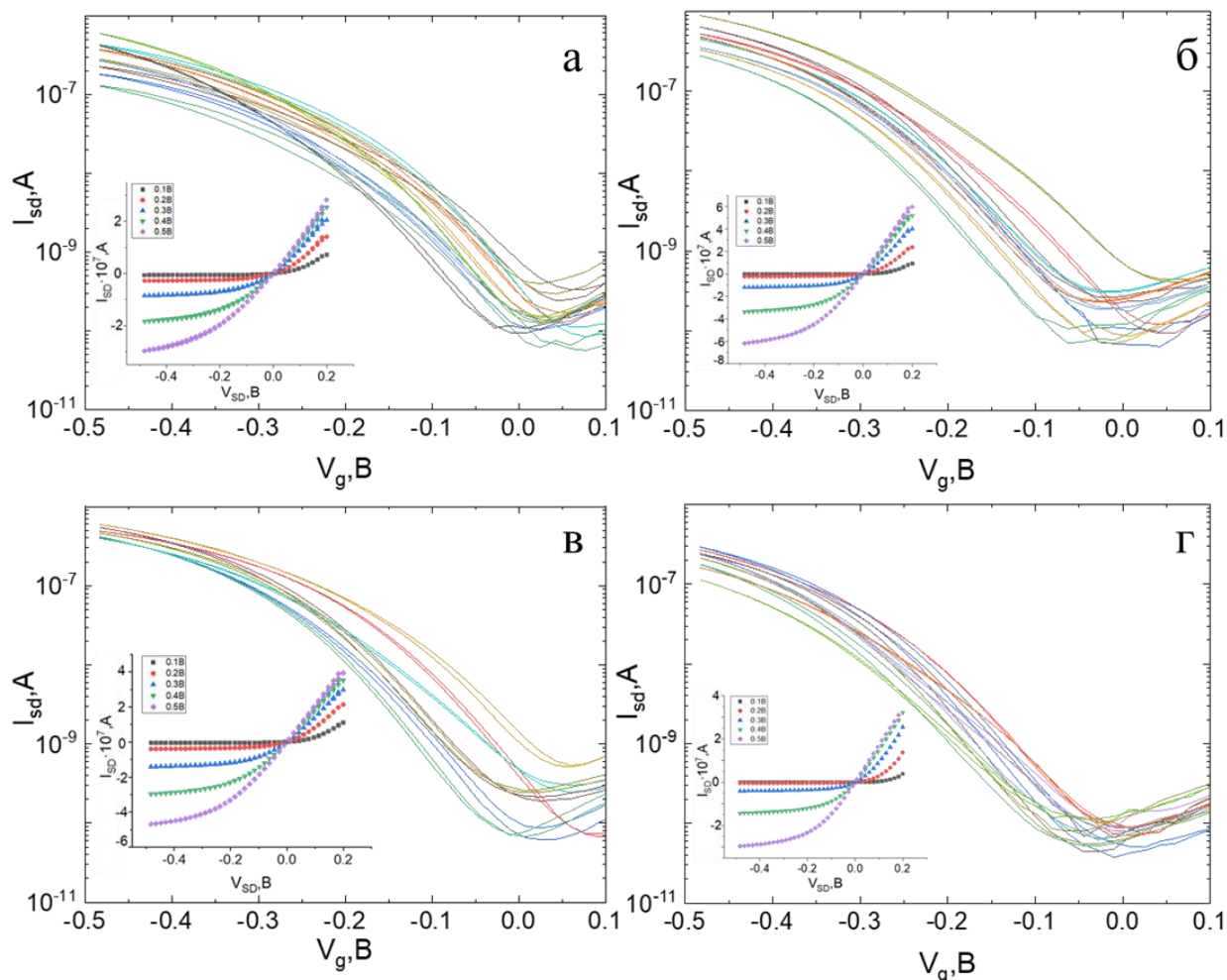


Рисунок 46 – Выходные (1 типичный пиксель в качестве примера) и передаточные (все работающие пиксели на подложке) характеристики ОПТЭЗ на основе ПС/ **C8-BTBT-C8** с нанесенными ЛШ слоями сополимеров различного состава: (а) 0% биотина, (б) 25% биотина, (в) 35% биотина, (г) 50% биотина

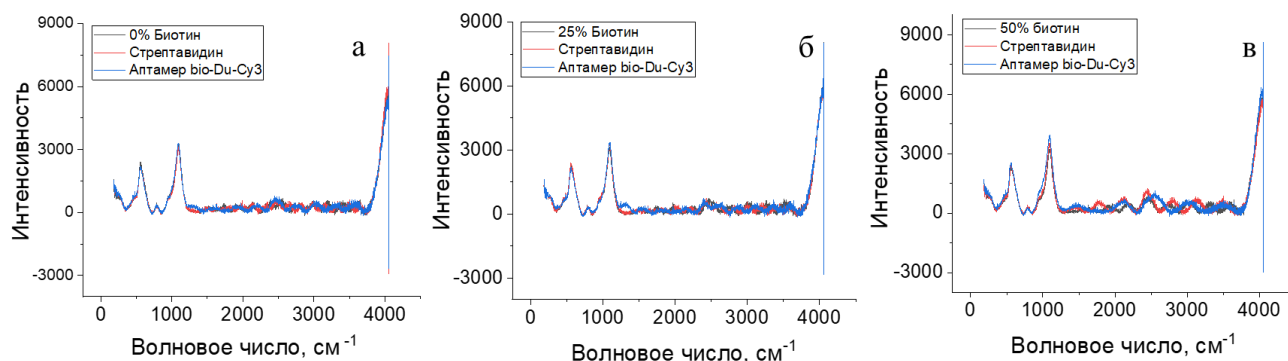


Рисунок 47— Рамановские спектры с поверхности ЛШ слоев сополимеров различного состава после иммобилизации стрептавида: (а) 0% биотина, (б) 25% биотина, (в) 50% биотина

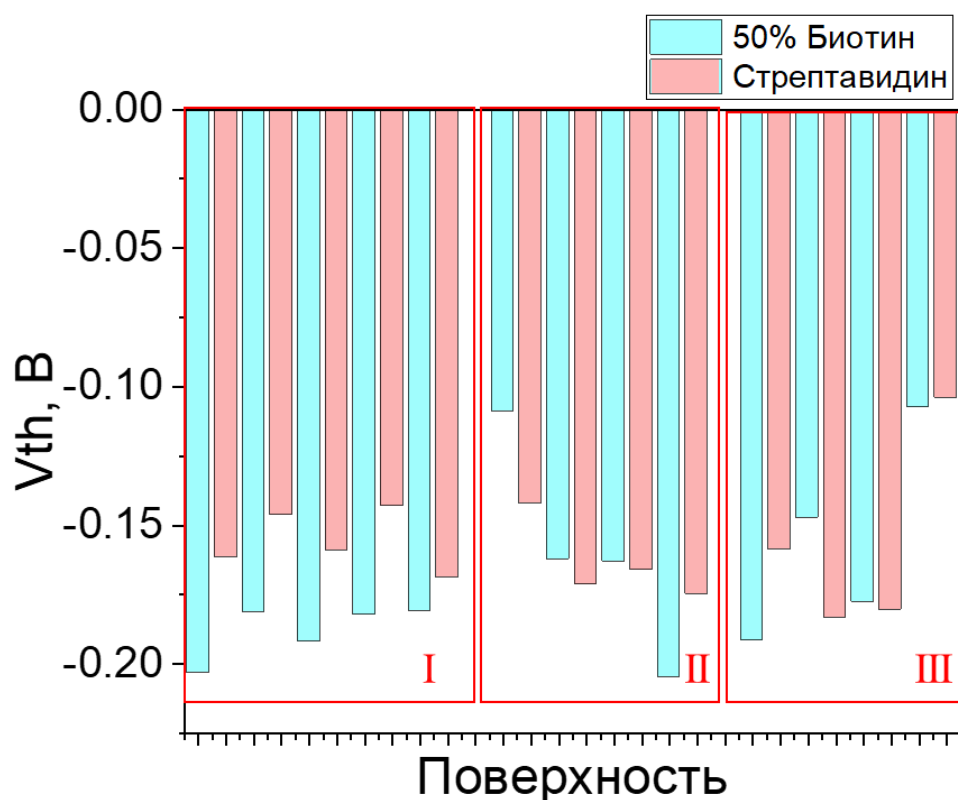


Рисунок 48 – Пороговые напряжения, измеренные для трех изготовленных в одинаковых условиях подложек ОПТЭЗ с ЛШМ слоем сополимера, содержащего 50% биотинных фрагментов, до и после иммобилизации стрептавида

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что вне зависимости от содержания биотинных фрагментов в составе сополимера, его молекулы упаковываются на поверхности воды таким образом, что силоксановые фрагменты обращены к воде и образуют с ней слабые водородные связи, тогда как боковые группы, содержащие ВТВТ-фрагмент, самопроизвольно кристаллизуются при растекании на поверхности воды и остаются обращенными к воздушной среде. Это обуславливает такой ЛШМ перенос слоя, при котором биотинные фрагменты, ответственные за дальнейшее взаимодействие со стрептавидином для формирования узнающего слоя, оказываются расположены «в глубине» ЛШМ-монослоя и не могут в полной мере обеспечить следующий шаг модификации. Взаимодействие со стрептавидином может происходить только на дефектах (разрывах) ЛШМ-монослоя, где биотинные фрагменты оказываются доступны, даже не находясь на поверхности слоя. Это объясняет плохую воспроизводимость изменения электрических характеристик ОПТЭЗ после иммобилизации стрептавида и общее малое количество стрептавида на поверхности ОПТЭЗ.

Возможным решением обнаруженной проблемы может стать использование при синтезе сополимеров основных полимерных цепей другой химической природы, например, полистирольных, которые будут достаточно гидрофобными, чтобы не взаимодействовать с

поверхностью воды. В таком случае можно ожидать, что взаимодействие биотин-содержащих сополимеров с поверхностью воды будет обеспечиваться биотиновыми фрагментами, что позволит им оказаться на поверхности рецепторного слоя при его переносе с поверхности воды на твердую подложку методом Ленгмюра-Шеффера и в дальнейшем принять участие во взаимодействии со стрептавидином, формируя узнающий слой биосенсора.

3.2. Разработка подхода к изготовлению биосенсорных устройств на основе ОПТЭЗ для многоразового использования

Данный раздел посвящен разработке подхода к изготовлению ОПТЭЗ-устройств, используемых в качестве биосенсоров для обнаружения вируса птичьего гриппа А и подходящих для многоразового использования, а также проверке применимости предложенной концепции, в т.ч. при работе в реальных биологических жидкостях. Полученные результаты опубликованы в статье:

E.Y. Poimanova, E.A. Kretova, A.K. Keshek, E.V. Andreev, A.N. Nechaev, K.A. Prusakov, K.G. Aldarov, D.V. Basmanov, A.I. Akhmetova, I.V. Yaminsky, S.A. Ponomarenko, E.G. Zavyalova, E.V. Agina. A universal approach to the fabrication of reusable EGOFET-based aptasensors with track-etched membranes for biorecognition layers// J. Mater. Chem. B – 2025. - Vol. 13. – P.4681-4692.

На сегодняшний день почти все биосенсоры на основе ОПТЭЗ и органических электрохимических транзисторов являются одноразовыми, а невозможность повторного использования таких устройств представляет собой серьезную проблему. В мировой литературе было опубликовано всего несколько статей, реализующих многоразовые биосенсоры на основе органических электролитических транзисторов (см. Раздел 5 Главы 1 Обзор литературы). Следует отметить, что все опубликованные подходы были разработаны для отдельных частных случаев и не могут быть использованы в качестве универсального способа создания многоразового биосенсора на основе органических электролитических транзисторов. Потому в данной работе нами была поставлена задача разработать универсальный подход к изготовлению многоразовых ОПТЭЗ-биосенсоров.

Литературные данные свидетельствуют о том, что применение трековых полимерных мембран позволяет обнаруживать различные классы аналитов (см. Раздел 5 Главы 1 Обзор литературы). При этом хотя электростатические взаимодействия в растворе электролита обычно считаются распространяющимися максимум до длины экранирования Дебая [17], существует несколько публикаций, где было показано, что биосенсоры на основе ОПТЭЗ могут успешно функционировать даже тогда, когда взаимодействие с целевым аналитом

происходит за пределами длины Дебая [17]. Эта информация дает надежду на возможность использования полимерных трековых мембран в качестве компонента ОПТЭЗ для биосенсорных измерений несмотря на то, что мембрана может располагаться на значительном расстоянии от токопроводящего слоя.

Исходя из вышеперечисленных соображений мы выбрали в качестве узнающих элементов полимерные трековые мембраны из полиэтилентерефталата с иммобилизованным на них аптамером, так как данные материалы термически и химически стабильны, имеют контролируемый размер пор, а также продемонстрировали привлекательные свойства в процессах микрофильтрации биологических жидкостей.

Выбор 2,7-диоктил[1]-бензотиено[3,2-b][1]бензотиофена (C8-BTBT-C8) в качестве полупроводникового материала для многоразовых ОПТЭЗ-аптасенсоров был обусловлен его успешным применением в ОПТЭЗ в предыдущих исследованиях, описанных в Разделах 3.1.1 и 3.1.2. В данном исследовании мы использовали ОПТЭЗ с нетипичным расположением рецепторного и узнающего слоев: они не были пришиты ни к слою органического полупроводника, ни к поверхности затвора. Вместо этого мы интегрировали данные слои между полупроводником и затвором, располагая их в электролите, как показано на рисунке 49. Такая интеграция была достигнута за счет использования трековых мембран из полиэтилентерефталата (ПЭТ) с контролируемой пористостью в качестве рецепторных слоев и иммобилизованного на них ДНК-аптамера в качестве узнающего слоя [220].

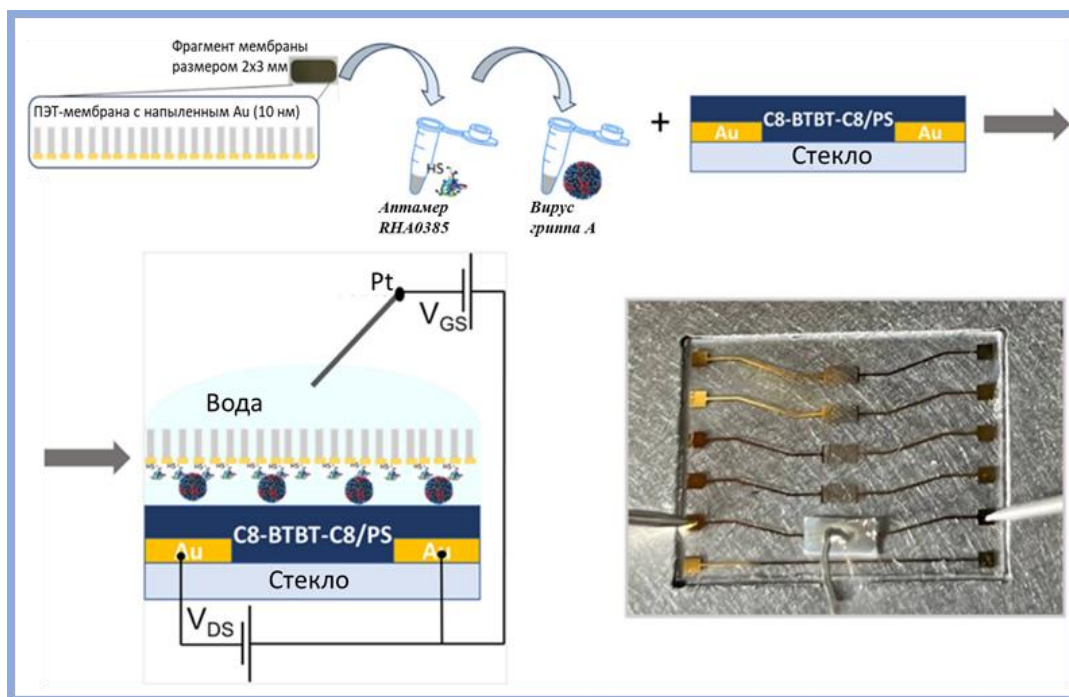


Рисунок 49 – Архитектура многоразового ОПТЭЗ-аптасенсора и фотография процесса измерений

Биоузнающий слой был изготовлен на фрагменте покрытой с одной стороны золотом трековой мембраны (ТМ), модифицированной аптамером RHA0385, что обеспечило возможность обнаружения вирусных частиц при помощи ОПТЭЗ-устройства. Модифицированная аптамером мембрана была погружена в тестовый раствор, содержащий вирус гриппа А, на 20 минут. Затем эта мембрана была помещена на поверхность слоя органического полупроводника ОПТЭЗ-устройства, модифицированной (покрытой золотом) стороной к слою органического полупроводника. После этого на поверхность мембраны была нанесена капля деионизированной воды для обеспечения контакта между мембраной и полупроводником через тонкий слой воды между мембраной и полупроводником за счет проникновения воды через мембрану. Затвор был погружен в каплю воды над мембраной, и были зарегистрированы электрические характеристики ОПТЭЗ (Рисунок 49).

Биоузнающий слой на основе модифицированных аптамерами мембран применим для широкого спектра аналитов и сред благодаря прочности полимерного материала, его химической инертности и нечувствительности к электролитам, используемым в биосенсорике. В то же время такой подход не предполагает какой-либо химической функционализации активных поверхностей ОПТЭЗ, приводящей к их деградации. Более того, возможность замены мембранного элемента новым открывает путь к созданию многоразовых устройств.

Подготовку поверхности мембраны для ее дальнейшей биомодификации аптамерами проводили путем нанесения на одну сторону мембраны золота толщиной 10 нм методом термического вакуумного напыления. Для корректной работы биосенсора площадь покрытой золотом мембраны и площадь, занимаемая электродами, должны были подобраны таким образом, чтобы биомодифицированная площадь покрытой золотом мембраны была больше площади канала, как показано на рисунке 49. При этом на каждом этапе электрических измерений обеспечивали одно и то же положение мембраны, строго над электродами ОПТЭЗ.

Золотые электроды представляли собой пары встречно-штыревых контактов и были получены методом литографии. Такая геометрия обеспечивает высокое отношение длины электродов (ширина канала, W) к расстоянию между электродами (длина канала, L) (так называемое соотношение W/L), снижая таким образом уровень шума, что позволяет изготавливать гораздо более чувствительные сенсоры, по сравнению с сенсорами на основе линейных неструктурированных каналов электродов. Размеры пятнадцати зубцов полученной гребенки составили: ширина зубца гребня - 2 мкм; длина зубца — 18 мкм; зазор между двумя соседними зубцами двух соседних гребней составлял 22 мкм; шаг зубцов — 40 мкм.

В качестве модельного объекта для подтверждения работоспособности предложенной концепции был выбран вирус гриппа А, поскольку его обнаружение необходимо для внедрения мер профилактики и контроля распространения гриппа, а также для того, чтобы

обеспечить корректное сравнение изготовленных биосенсоров с ранее опубликованными одноразовыми ОПТЭЗ-биосенсорами.

Аптамер RNA0385 был выбран в качестве узнающего элемента благодаря своей способности связываться с различными вирусами гриппа А. Ранее было показано, что RNA0385 имеет структуру параллельного ДНК-G-квадруплекса с тремя G-тетрадами, расположенными друг над другом. Третичная структура аптамера стабильна до 50 °C [222] и в различных биологических жидкостях. Аптамер связывается с гемагглютиниными H1, H3, H5, H7 и H9 с константами диссоциации в низком наномолярном диапазоне. Благодаря наличию SH-функциональной группы, аптамер RNA0385 надежно прикрепляется к золоту на поверхности мембраны во время инкубации. Поскольку ранее было показано, что концентрация аптамера, равная 200 нМ, является оптимальной для захвата вируса гриппа А металлизированной ПЭТ-мембраной [199], а также металлизированными литографическими поверхностями [224], то мы использовали именно эту концентрацию.

Предполагалось, что в условиях эксперимента аптамеры не прилегают слишком плотно к мембране, что позволяет им распознавать целевые мишени. Вирусы гриппа А осаждали на поверхность узнающей полимерной мембраны путем простой инкубации в растворе, содержащем вирус, с последующей промывкой дистиллированной водой. Образование комплекса аптамер-вирус в растворе согласно литературным данным занимает 5 минут при перемешивании [231]. В данном эксперименте время инкубации вируса было выбрано равным 20 мин на основе данных, описанных в статье [223], чтобы учесть более медленную диффузию вируса в отсутствие перемешивания. Таким образом, используя простые методы инкубации, был получен заменяемый элемент ОПТЭЗ-аптасенсора с биоузнающей поверхностью (рисунок 49).

Учитывая изменение архитектуры исследуемых ОПТЭЗ-устройств за счет размещения трековой мембраны непосредственно на поверхности органического полупроводника, были проведены эксперименты, чтобы подтвердить сохранение работоспособности устройства. Сравнение передаточных характеристик исходного ОПТЭЗ-устройства на основе **С8-ВТВТ-С8**, а также ОПТЭЗ-устройств с исходной трековой мембраной и с мембраной, покрытой с одной стороны золотом и повернутой золотой стороной к поверхности полупроводника, представлено на рисунке 50а. Обнаружено, что ОПТЭЗ, содержащие мембраны в своей архитектуре, сохранили хорошие электрические свойства, что подтверждается их передаточными характеристиками (рисунок 50а), измеренными в деионизированной воде. Ток стока-истока демонстрирует хорошо выраженные линейные области, а также области насыщения при подаче напряжения на затвор. Отношение токов во включенном и выключенном состояниях, а также пороговое напряжение, усредненные по 15 образцам,

составили 1000 ± 300 и $0,25 \pm 0,05$ В, соответственно, что позволяет использовать полученные устройства в качестве биосенсоров.

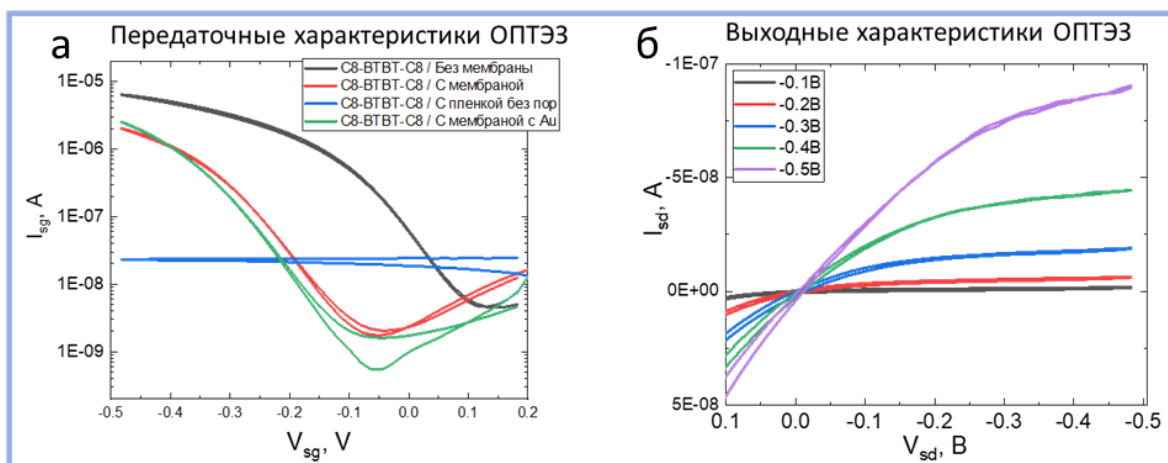


Рисунок 50 – (а) Передаточные характеристики ОПТЭЗ с трековыми мембранами и без них. (б) Выходные характеристики ОПТЭЗ с мембраной, покрытой золотом

Согласно полученным данным, использование трековой мембраны в составе ОПТЭЗ не оказывает критического влияния на электрические характеристики устройства. Более того, осаждение золота на поверхность мембраны в качестве этапа подготовки к функционализации также не влияет на электрические характеристики устройства. Токи стока-истока немного снижаются по сравнению с исходным устройством на основе **C8-BTBT-C8**; однако выходные характеристики транзистора не ухудшаются, а ток утечки остается в диапазоне нА, при этом наблюдается очень низкий гистерезис. Полевые свойства транзистора с мембраной, покрытой золотом, подтверждаются выходными характеристиками в диапазоне от 0,1 до 0,5 В и приведены на рисунке 50б.

Что касается возможности использования пленки мембранного материала, полиэтилентерефталата, не содержащей пор, то при ее размещении на полупроводниковой поверхности измерение передаточных характеристик показывает, что после приложения напряжения изменения тока не происходит (рисунок 50а, синяя кривая). Это означает, что только наличие пор в трековых мембранах позволяет использовать их в качестве элементов ОПТЭЗ благодаря возможности проникновения ионов через мембрану на полупроводниковую поверхность. Утечки электролита через границы мембраны не происходит, поскольку капля затворного электролита располагается только на мембране, и только эта область вносит вклад в электрические характеристики устройства.

Электрические измерения в насыщенном режиме ($V_{DS} = 0,5$ В) проводили для определения передаточных характеристик изготовленных устройств с узнающим слоем на мембране в соответствии со схемой, показанной на рисунке 49. После каждого этапа инкубации устройство промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и деионизированной

водой для удаления несвязанных молекул; затем измерения проводили в деионизированной воде. Для определения влияния ориентации мембраны относительно поверхности органического полупроводника на отклик устройства мы сравнивали расположение позолоченной стороны мембраны по направлению к каналу транзистора или от него. Было обнаружено, что отклик устройства наблюдается только для первого варианта, когда позолоченная (модифицированная аптамером) поверхность была повернута к каналу со слоем органического полупроводника. На рисунке 51 приведены полученные результаты для устройства с мембраной, размер пор которой составлял 60 нм, для варианта ориентации мембраны позолоченной стороной к полупроводнику.

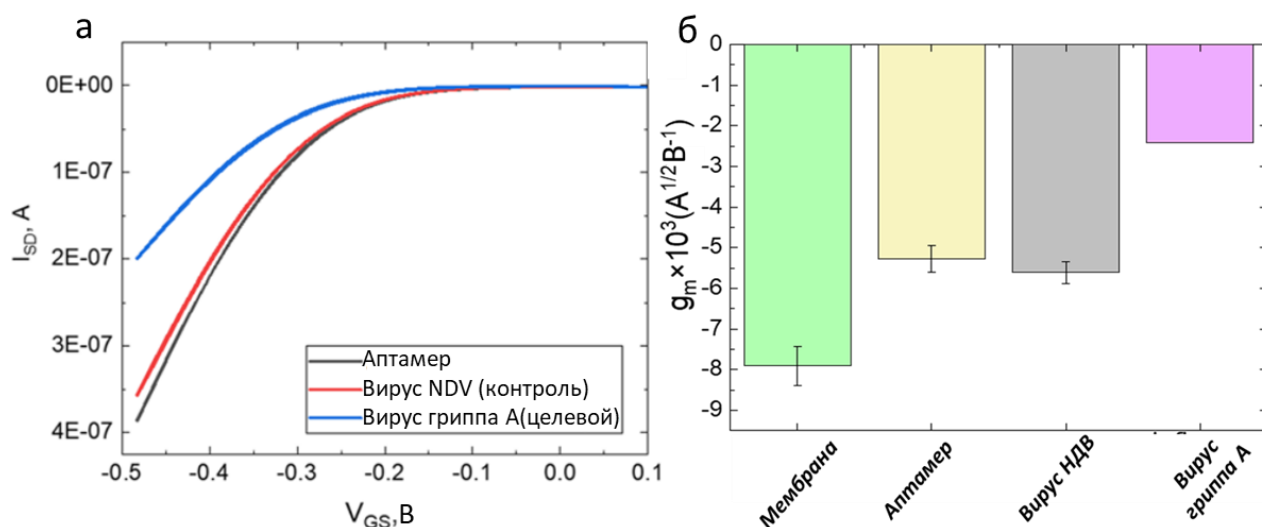


Рисунок 51 – Передаточные характеристики (а) и передаточная проводимость (б) ОПТЭЗ-аптасенсора с трековой полиэтилентерефталатной мембраной, повернутой позолоченной стороной к каналу транзистора, с размером пор 60 нм, с иммобилизированными на нее аптамером и вирусами: вирусом гриппа А и вирусом болезни Ньюкасла

В то же время различий между электрическим откликом устройства на вирус гриппа А и вирус болезни Ньюкасла (NDV) для второго варианта ориентации мембраны (позолоченной стороной наружу от канала транзистора) практически не наблюдалось (Рисунок 52). Причина, по-видимому, заключается в том, что при таком варианте ориентации мембраны аналит находится на очень большом расстоянии от слоя полупроводника. Исходя из полученных результатов, все дальнейшие исследования проводили в первой конфигурации устройства.

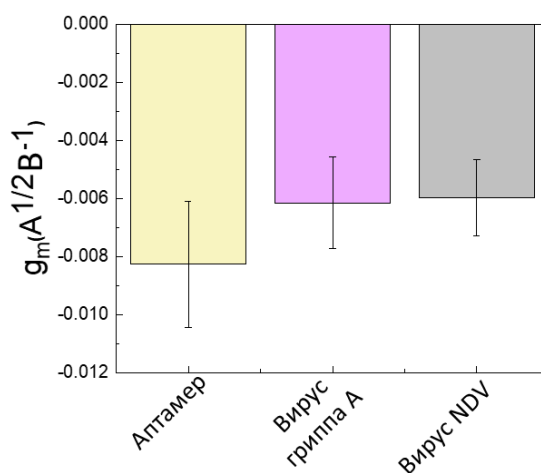


Рисунок 52 – Реакция ОПТЭЗ-аптасенсора на целевой и контрольный вирусы. Сторона мембраны, покрытая золотом (биомодифицированная), ориентирована наружу от слоя органического полупроводника

Таким образом, модификация поверхности ОПТЭЗ с помощью трековой мембраны с осажденным на поверхность мембраны аптамером, приводит к изменению токов устройства, при этом устройство сохраняет свои полевые свойства транзистора, что позволяет использовать его в качестве биосенсора. Сдвиг порогового напряжения ОПТЭЗ после иммобилизации вируса гриппа А (штамм H7N1, $6 \cdot 10^6$ вирусных частиц на мл) по сравнению с пороговым напряжением устройства с мембраной, модифицированной аптамером, можно увидеть на рисунке 51а. В качестве параметра отклика была выбрана характеристика крутизны наклона передаточной кривой в насыщенном режиме работы транзистора, называемая передаточной проводимостью, g_m (рисунок 51б), чтобы сравнить чувствительность разработанной архитектуры ОПТЭЗ с ранее опубликованной чувствительностью, достигнутой для биоузнающего слоя на основе биотин-стрептавидинового взаимодействия. Вывод о наличии сенсорного отклика устройства был сделан на основании значительной разницы между $g_m(\text{Apt})$ и $g_m(\text{Vir})$, где $g_m(\text{Apt})$ — передаточная проводимость ОПТЭЗ с золотой мембраной, покрытой аптамером, а $g_m(\text{Vir})$ — передаточная проводимость ОПТЭЗ после иммобилизации вируса на мембрану.

Была также проведена серия контрольных измерений для исключения неспецифического связывания аналитов на поверхности мембраны или внутри ее пор, которое могло бы привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Показано, что электрические характеристики ОПТЭЗ оставались постоянными в пределах погрешности измерений после иммобилизации вируса болезни Ньюкасла (NDV, $5 \cdot 10^6$ вирусных частиц на мл) на обработанную аптамером RHA0385 поверхность мембраны, как показано на рисунке 51б. Также был получен отрицательный контроль для иммобилизации вирусов гриппа А или

NDV непосредственно на поверхности мембраны, покрытой золотом, без предварительной иммобилизации на нее аптамера (рисунок 53).

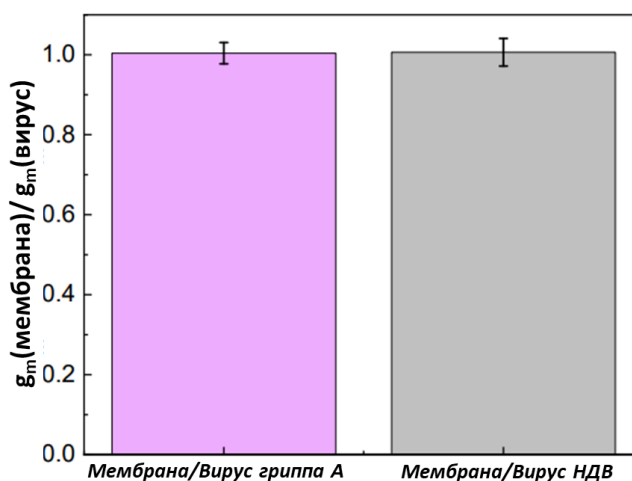


Рисунок 53 – Передаточные характеристики ОПТЭЗ-устройства с трековой мембраной, без иммобилизации аптамера на поверхность мембраны, но с иммобилизованными вирусом гриппа А и вирусом болезни Ньюкасла

Таким образом, устройства, не имеющие элемента узнавания (специфичного к целевому аналиту аптамера) на поверхности мембраны, не демонстрируют значительной реакции на оба вируса. Это позволяет сделать вывод о том, что аптасенсор на основе ОПТЭЗ с биоузнающим слоем аптамера RNA0385, размещенным на ПЭТ-мембране, проявляет способность к специфическому обнаружению вируса гриппа А, которое может быть зарегистрировано по изменению порогового напряжения и передаточной проводимости, измеренных в насыщенном режиме.

Хорошо известно, что размер вируса гриппа А составляет около 100 нм [232,233]. Для выбора оптимального размера пор мембраны с целью обеспечения высокой чувствительности ОПТЭЗ-аптасенсора был исследован широкий диапазон размеров пор (d) мембран, полученных методом трекового травления, включая поры диаметром 35, 60, 400, и 1000 нм. Поры с $d = 35$ нм в 3 раза меньше, чем вирусные частицы, что затрудняет их проникновение через мембрану. Диаметр пор 60 нм довольно близок к размеру вириона, тогда как другие мембраны имеют гораздо большие поры (400 нм и 1000 нм), что обеспечивает возможность проникновения вируса через мембрану. Чувствительность ОПТЭЗ-аптасенсора с мембранами, имеющими разные размеры пор, к вирусу гриппа А была исследована в широком диапазоне его концентраций: от $1 \cdot 10^9$ до $6 \cdot 10^4$ ВЧ/мл вируса гриппа А (рисунок 54).

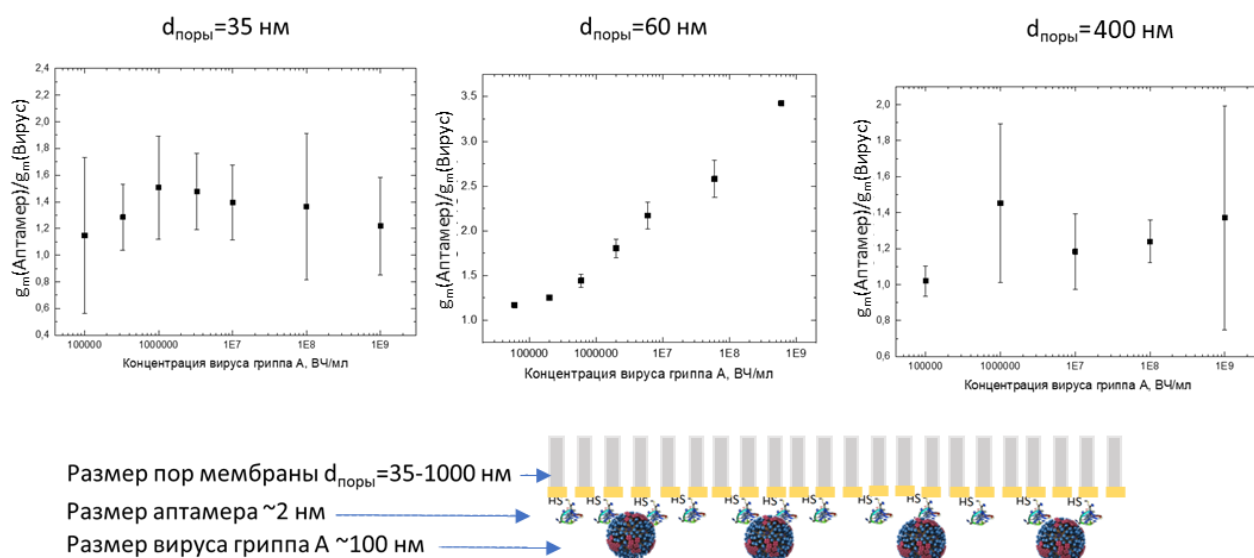


Рисунок 54 – Зависимость величины сенсорного отклика ОПТЭЗ-аптасенсора на вирус гриппа А от концентрации вируса для мембран с различными размерами пор

Из представленных данных видно, что сенсорный отклик на присутствие вируса гриппа А проявили все исследованные ОПТЭЗ вне зависимости от величины пор ПЭТ-мембраны, однако монотонная зависимость отклика от концентрации вируса, а также высокая воспроизводимость величины отклика для разных пикселей (наименьшая ошибка измерений для конкретной концентрации, приведенная на графиках на рисунке 54) наблюдались только для ОПТЭЗ с мембраной, имеющей диаметр пор 60 нм. Объяснение наблюдаемых зависимостей может быть связано с механизмом сенсорной чувствительности разработанного ОПТЭЗ.

Предложенный механизм изменения передаточной проводимости ОПТЭЗ после захвата вируса аптамером связан с изменениями в распределении заряда внутри электролита и, как следствие, на границах раздела затвор-электролит и электролит-полупроводник, т.е. с изменениями в двойных электрических слоях. Крупная вирусная частица размером 100 нм взаимодействует с аптамером размером 2 нм в приложенном электрическом поле и под действием поля стремится переместиться сквозь мембранную пору под действием капиллярных и электростатических эффектов, захватывая с собой ионы электролита и частично изменяя конформацию аптамера, связанного с поверхностью золота с одной стороны и с вирусом с другой стороны.

Капиллярный и электростатический эффекты совместно обеспечивают движущую силу для перемещения вируса сквозь трековую мембрану, вместо его закрепления на золотой поверхности, расположенной только с одной стороны мембраны. Эта гипотеза объясняет наблюдаемую зависимость сенсорного отклика от размера пор. Отклик на иммобилизацию вируса на мембране наблюдался для всех исследованных размеров пор; однако в случаях

малых (35 нм) и больших (400 нм) размеров пор воспроизводимость была очень низкой, значения отклика были ниже, и не наблюдалось монотонной зависимости отклика от концентрации вируса. Это можно объяснить тем, что частицы проникают через мембрану при приложенном напряжении. В случае больших пор капиллярным эффектом можно пренебречь из-за большой (почти в четыре раза) разницы между размером вируса и размерами пор, тогда как в случае малых пор они слишком малы, чтобы пропускать крупные частицы вируса через пору.

Для подтверждения предложенной гипотезы и лучшего понимания процессов и взаимодействий, происходящих во время детектирования с помощью ОПТЭЗ-аптасенсоров с биоузнающим слоем на трековых мембранах, была проведена сканирующая электронная (СЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ) поверхностей мембран после напыления слоя золота, иммобилизации аптамера и вируса (рисунок 55).

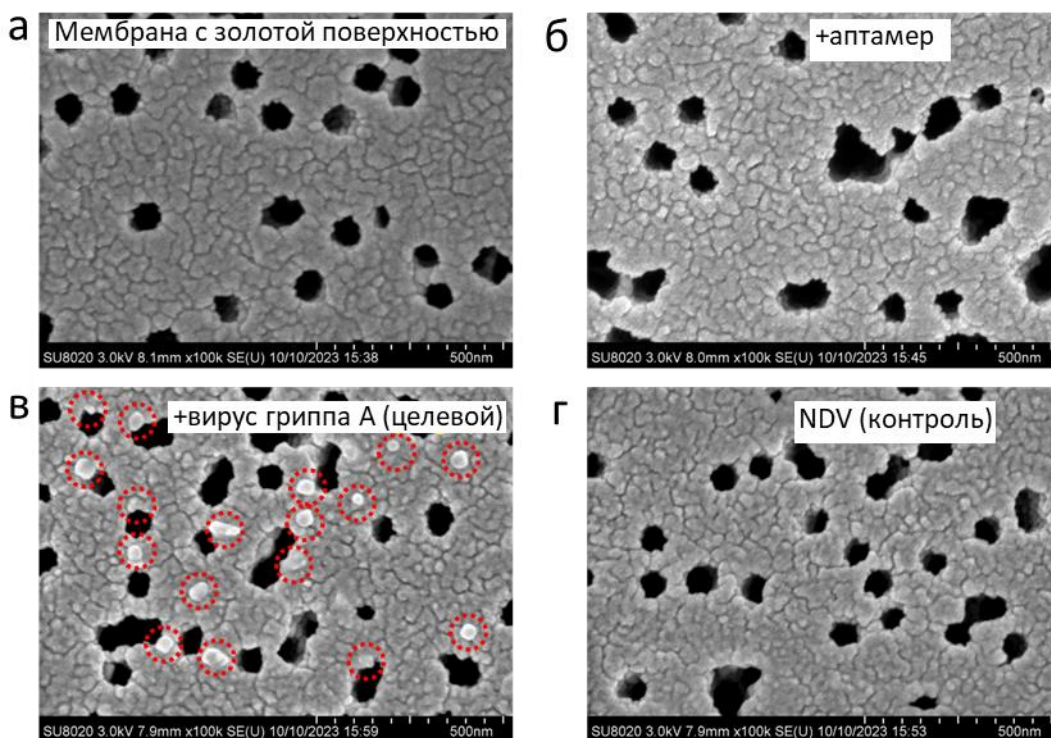


Рисунок 55 – СЭМ-изображения поверхности трековой мембраны с размером пор 60 нм, покрытой золотом и используемой в качестве биоузнающего слоя в ОПТЭЗ-аптасенсоре (а), поверхность мембраны, покрытая золотом, после иммобилизации аптамера (б); поверхность мембраны, покрытая золотом, с аптамером после иммобилизации вируса гриппа А (целевой анализ) (в); поверхность мембраны, покрытая золотом, с аптамером после иммобилизации вируса болезни Ньюкасла (контрольный эксперимент) (г)

С помощью СЭМ можно различить только вирусные частицы, в то время как размер аптамера достаточно мал, чтобы оценить его распределение на поверхности. Однако взаимодействие между золотом на поверхности мембраны и SH-группой ДНК-аптамера определенно вызывает образование ковалентной связи, что обеспечивает стабильное покрытие аптамером золотой поверхности мембраны.

На рисунках 55в 56а видны вирусные частицы гриппа А на покрытой золотом поверхности мембраны с размером пор 60 нм, расположенные как на поверхности между порами, так и внутри пор (рисунок 56а). Последнее утверждение становится более очевидным после анализа обратной стороны мембраны с размером пор 60 нм (рисунок 56б). Обратная сторона мембраны не была покрыта золотом, и, как следствие, она не была функционализирована аптамером, однако некоторый материал можно наблюдать на гладкой поверхности мембраны и внутри пор. Чтобы доказать, что эффект проникновения вируса через мембрану происходит только при приложенном на затвор напряжении во время электрических измерений, была проведена сканирующая электронная микроскопия обеих поверхностей мембраны после иммобилизации вируса без приложения напряжения на затвор (Рисунок 57). Из рисунка видно, что агрегаты вируса заполняют покрытую золотом поверхность мембраны, но на обратной стороне мембраны не видно никакого вирусоподобного материала. Это наблюдение демонстрирует, что вирусные частицы могут проникать через поры в мембранах при приложении электрического напряжения за счет капиллярного и электростатического эффектов. Контрольный эксперимент с вирусом болезни Ньюкасла показывает практически полное отсутствие какого-либо биологического материала как на золотой поверхности мембраны (рисунок 56в), так и на ее обратной стороне (рисунок 56г) с тем же размером пор, равным 60 нм, из-за отсутствия взаимодействия между аптамером и неспецифическим для данного аптамера вирусом.

Анализ калибровочных кривых ОПТЭЗ-аптасенсора с трековыми мембранами, имеющими различные размеры пор (рисунок 54) показал, что мембраны с размером пор 400 нм не подходят для чувствительного обнаружения вирусов из-за высокого разброса величин отклика устройства. Это означает почти свободное проникновение частиц в составе электролита через крупные поры мембраны при приложении напряжения, обусловленное капиллярными и электростатическими эффектами, поскольку в данном случае размер поры в четыре раза больше, чем размер частицы вируса. Изображения поверхности, полученные с помощью СЭМ, показывают, что внутри пор размером 400 нм (рисунок 56д) или на их обратной стороне (рисунок 56е) не остается никакого материала.

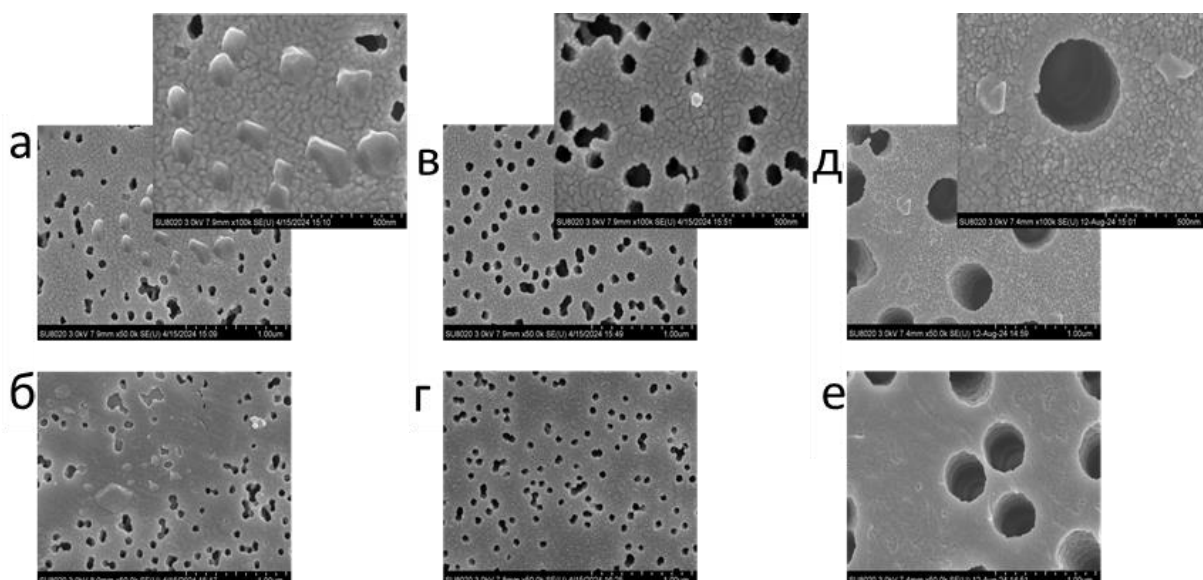


Рисунок 56 – СЭМ-изображения покрытой золотом и обратной (гладкой) сторон трековых мембран с различным размером пор, использованных в ОПТЭЗ-аптасенсорах и сканированных после измерения вирусов. Размер пор 60 нм: а) покрытая золотом поверхность, вирус гриппа А; б) обратная сторона, вирус гриппа А; в) покрытая золотом поверхность, вирус болезни Ньюкасла; г) обратная сторона, вирус болезни Ньюкасла; Размер пор 400 нм: д) покрытая золотом поверхность, вирус гриппа А; е) обратная сторона, вирус гриппа А

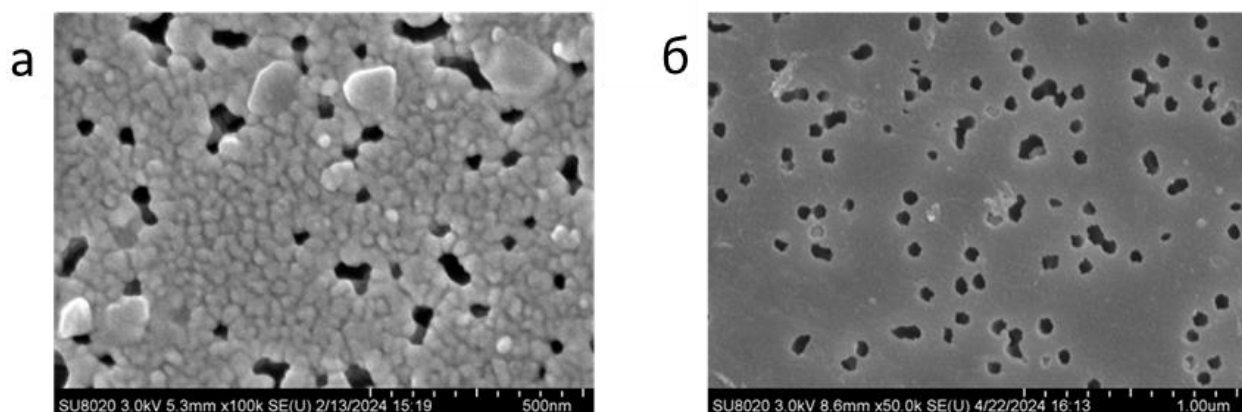


Рисунок 57 – СЭМ-изображения поверхности трековых мембран с размером пор 60 нм после иммобилизации аптамера и вируса гриппа А, полученные без проведения электрических измерений: (а) поверхность мембраны, покрытая золотом, (б) обратная сторона мембраны

Информация, полученная в результате исследования поверхности мембран методом АСМ, хорошо согласуется с результатами анализа, полученными методом СЭМ для трековых мембран с размером пор 60 (рисунок 58а, в) и 400 нм (рисунок 58б, г). С обеих сторон трековой мембраны с размером пор 60 нм, модифицированной аптамером и инкубированной в растворе вируса гриппа А после электрических измерений можно обнаружить хорошо различимые объекты, которые можно отнести к частицам вируса, на основе их ширины и высоты. Аналогично, частицы можно обнаружить на поверхности мембран с размером пор 400 нм (рисунок 58б). Контрольные эксперименты с вирусом болезни Ньюкасла (NDV) показывают

почти полное или полное отсутствие вирусных частиц на мембранах размером 60 нм (Рисунок 58в) и 400 нм (Рисунок 58г), что доказывает специфическое взаимодействие ДНК-аптамера RHA0385 с вирусом гриппа А.

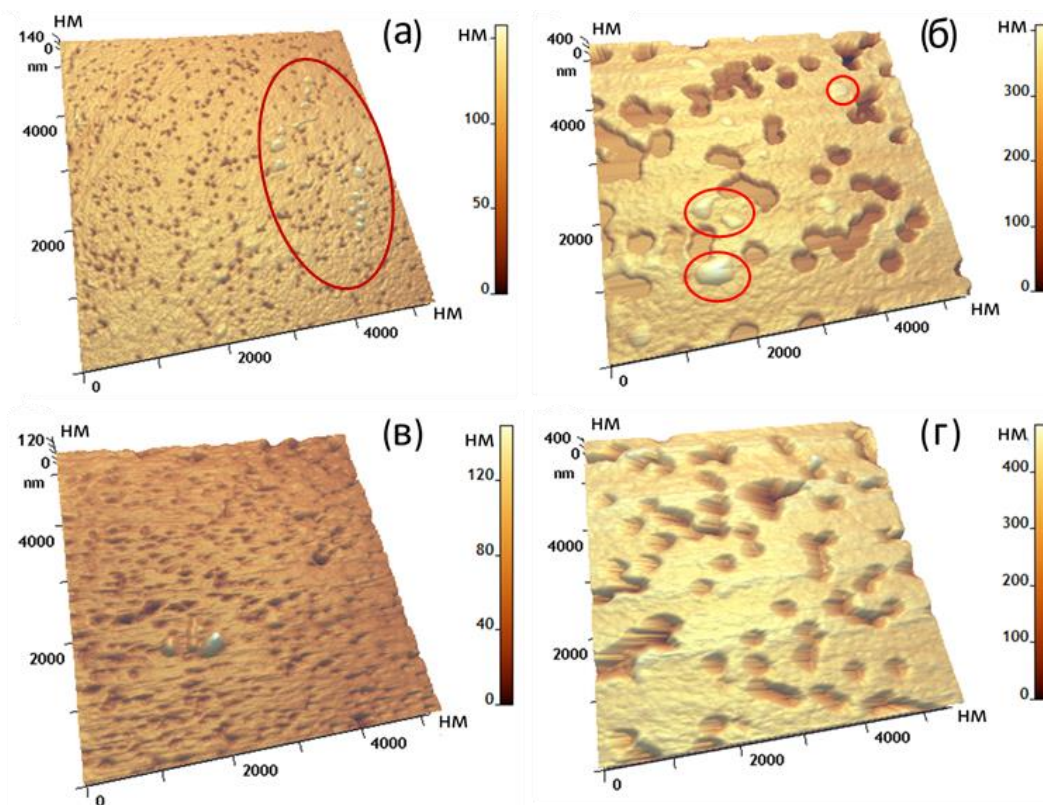


Рисунок 58 – АСМ-изображения покрытых золотом поверхностей трековых мембран после электрических измерений ОПТЭЗ. Размер пор 60 нм: (а) вирус гриппа А; (в) вирус болезни Ньюкасла; Размер пор 400 нм: (б) вирус гриппа А; (г) вирус болезни Ньюкасла

Таким образом, в результате проведенных исследований была установлена оптимальная чувствительность ОПТЭЗ-аптамасенсора с трековой мембраной, достигаемая при размере пор, равном 60 нм, и имеющая монотонную зависимость от концентрации вируса в интервале концентраций $10^9 - 6 \cdot 10^4$ ВЧ/мл (рисунок 54). Можно также утверждать, что биоузнающий слой, сформированный на трековой мембране, обеспечивает предел обнаружения вируса гриппа А не хуже, чем биоузнающий слой, сформированный за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия и расположенный непосредственно на полупроводниковом слое **С8-ВТВТ-С8**, как это было описано в Разделе 3.1.1 данной работы.

Следует отметить, что предел обнаружения в обоих случаях был рассчитан на основе линейной регрессии величины сигнала сенсорного отклика в зависимости от логарифма концентрации вируса гриппа А (использовали только восходящую часть кривой). Предел обнаружения был оценен как концентрация вируса, которая увеличивала величину изменения относительной передаточной проводимости на три стандартных отклонения по сравнению с величиной относительной передаточной проводимости в контрольном образце.

ОПТЭЗ-аптасенсоры с трековыми мембранами обладают преимуществом перед ОПТЭЗ-аптасенсорами с рецепторным слоем, расположенным на поверхности полупроводника или затвора, благодаря возможности простого повторного использования такого устройства. Поскольку все процессы биоузнавания происходят на поверхности мембраны, то мембрану можно заменить, а устройство использовать снова. Для оценки возможности повторного использования разработанной архитектуры ОПТЭЗ электрические характеристики ОПТЭЗ-аптасенсора с полупроводниковым слоем на основе **C8-BTBT-C8** контролировали до и после сенсорных измерений вируса гриппа А с помощью трековой мембраны, покрытой золотом и аптамером (рисунок 59а). Сопутствующие измерениям изменения основных электрических характеристик ОПТЭЗ показаны на рисунке 59б. Ток включения после измерений уменьшается на порядок, в то время как отношение тока включения/выключения увеличивается в два раза. Незначительное снижение передаточной проводимости и изменение порогового напряжения позволяют ОПТЭЗ оставаться в очень хорошем рабочем состоянии после измерений сенсора с трековой мембраной в качестве узнающего элемента.

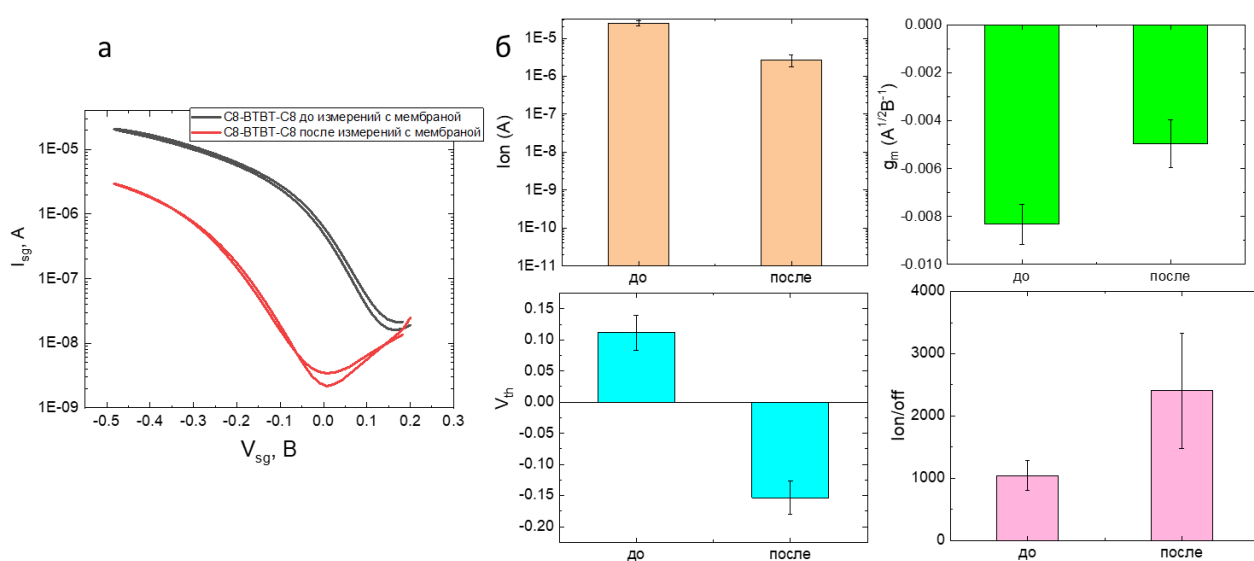


Рисунок 59 – Изменения электрических характеристик ОПТЭЗ-аптасенсора с полупроводниковым слоем на основе **C8-BTBT-C8** до и после сенсорных измерений вируса гриппа А с помощью трековой мембраны: (а) передаточные характеристики и (б) изменения параметров транзистора: I_{on} , V_{th} , g_m , I_{on}/I_{off}

Согласно изображениям АСМ (рисунок 60), качество пленки полупроводникового слоя не претерпевает серьезных ухудшений после проведения сенсорных измерений, поэтому все наблюдаемые электрические изменения можно объяснить незначительными деформациями пленки, вызванными использованием электролитной среды, а не влиянием мембраны. Этот факт обусловлен высокой стабильностью полупроводниковой пленки **C8-BTBT-C8** и неразрушающим подходом к сенсорным измерениям с использованием достаточно мягкого

мембранного материала из полиэтилентерефталата. Представленные измерения включали как минимум трехкратное размещение/замену мембранного элемента на слое органического полупроводника для электрических измерений с элементами мембран, покрытыми золотом, аптамером и вирусом, что демонстрирует возможность повторного использования платформы. Видно, что слой полупроводника не был существенно поврежден по меньшей мере в течение трех замен трековой мембраны на поверхности устройства.

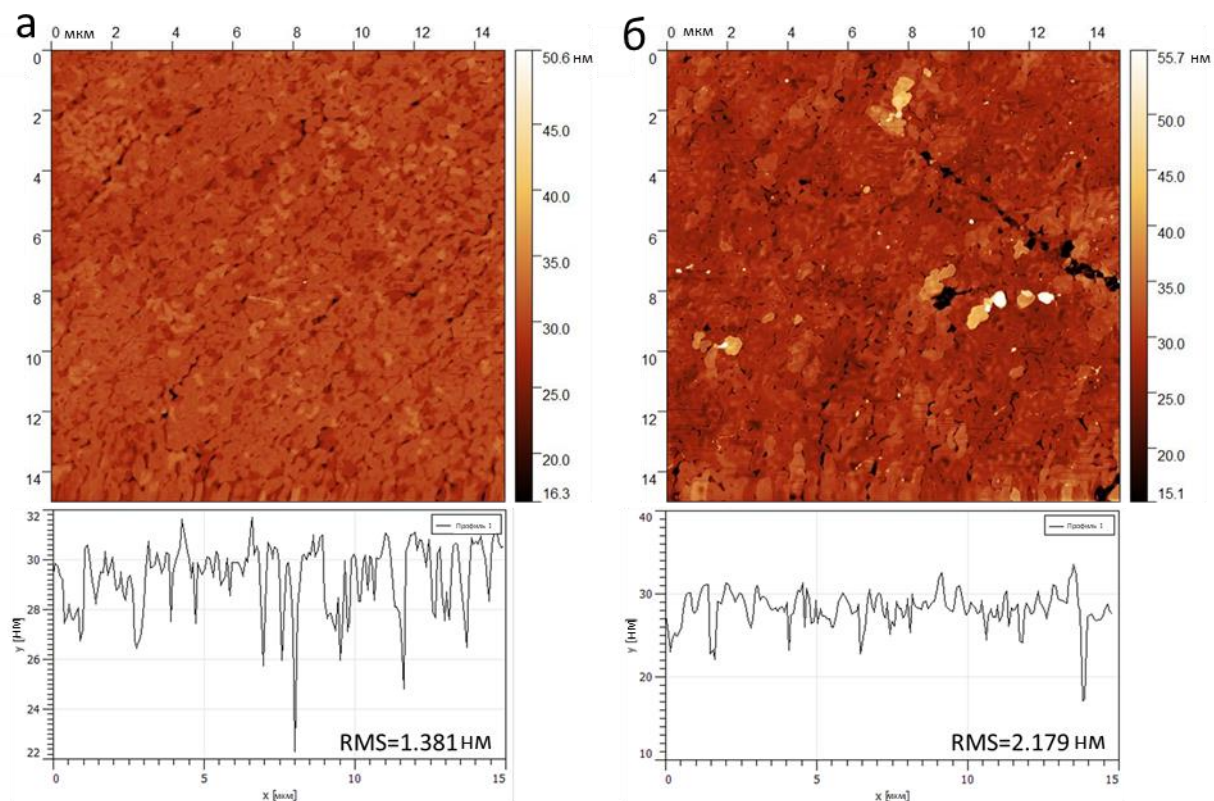


Рисунок 60 – АСМ-изображения (топология) слоя органического полупроводника **C8-BTBT-C8** до (а) и после (б) электрических измерений с использованием трековой мембраны

Сравнение откликов ОПТЭЗ-аптасенсора на вирус гриппа А с концентрацией $6 \cdot 10^6$ ВЧ/мл в модельном растворе (вирус гриппа А в солевом фосфатном буфере) и в реальном образце биологической жидкости (вирус гриппа А в назальном мазке) показало, что влияние биологической жидкости незначительно (рисунок 61). Отклики на вирус для модельного и реального образцов различаются всего в 1,17 раза, что находится в пределах экспериментальной погрешности. Следует отметить, что результаты, полученные в биологической жидкости, имеют больший разброс, однако остаются различимыми по сравнению с контрольным экспериментом, проведенным для вируса болезни Ньюкасла. Таким образом, разработанный ОПТЭЗ-аптасенсор может быть применен для исследования реальных назальных мазков, содержащих вирус в концентрации, типичной для пациентов с гриппом.

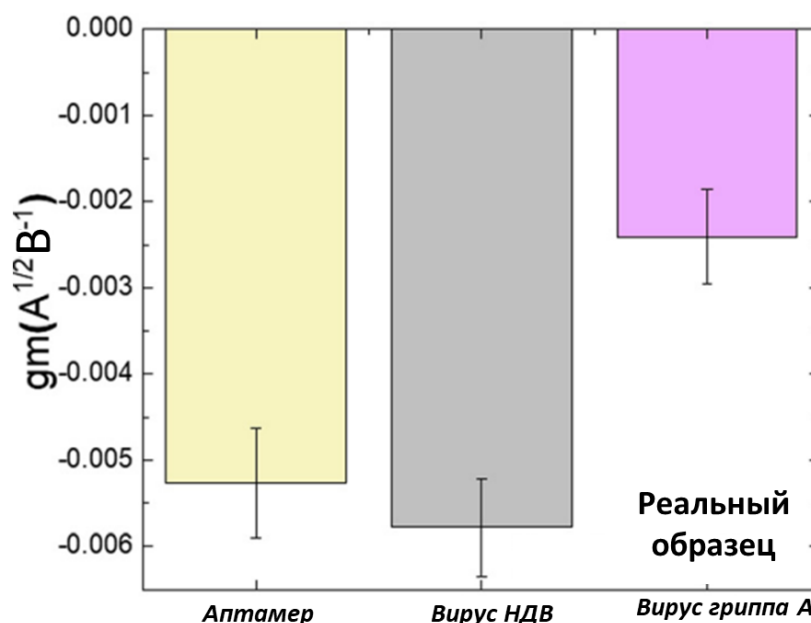


Рисунок 61 – Отклик ОПТЭЗ-аптасенсора на реальный образец биологической жидкости (назальный мазок), содержащий целевой (вирус гриппа А) или контрольный (вирус болезни Ньюкасла) вирусы

Таким образом, в результате проведенной работы, был разработан и успешно продемонстрирован универсальный подход к изготовлению многоразовых ОПТЭЗ-аптасенсоров с использованием полимерных трековых мембран в качестве дешевых одноразовых элементов для биоузнающих слоев для обнаружения вируса гриппа А. Наиболее подходящий размер пор трековых мембран был определен как 60 нм, что достаточно для проникновения вирусных частиц гриппа А и их захвата вблизи токонесущего слоя ОПТЭЗ. Чувствительность ОПТЭЗ-аптасенсора с трековыми мембранами к вирусу гриппа А оказалась сопоставимой с чувствительностью одноразовых ОПТЭЗ-биосенсоров, имеющих биоузнающий слой, расположенный на полупроводниковом слое **С8-ВТВТ-С8**. Предел обнаружения разработанного устройства был определен как равный $6 \cdot 10^4$ ВЧ/мл, что превосходит предел обнаружения экспресс-тестов на основе антител ($1 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^8$ ВЧ/мл), но уступает пределу обнаружения ПЦР-метода ($3 \cdot 10^2 - 1,2 \cdot 10^3$ ВЧ/мл). Таким образом, нами была реализована первая демонстрация концепции биофункционализированной трековой полимерной мембраны, интегрированной с высокоэффективным сенсором на основе ОПТЭЗ, способным работать в реальной биологической жидкости – назальном мазке. Этот подход открывает путь для простой разработки универсальных портативных устройств, состоящих из быстрых, неинвазивных, миниатюрных и многоразовых сенсоров для обнаружения широкого спектра аналитов, распознаваемых ДНК-аптамерами.

3.3. Разработка подхода к изготовлению мультисенсорных устройств на основе ОПТЭЗ

Третий раздел посвящен разработке подхода к изготовлению ОПТЭЗ-аптасенсора, способного к многоцелевому обнаружению аналитов с использованием одного чипа, результаты исследований опубликованы в работах:

1. E.Y. Poimanova, **E.A. Kretova**, A.K. Keshek, A.T. Trul, E.G. Zavyalova, E.V. Agina. Single-chip multitarget detection by EGOFET-based aptasensor // J. Mater. Chem. B – 2026. – Т. 14. – С. 2543-2555.
2. Shaposhnik P. A., Poimanova E.Y., Abramov A. A., Trul A. A., Anisimov D. S., **Kretova E. A.**, Agina E. V., Ponomarenko S. A. Applying of C8-BTBT-Based EGOFETs at Different pH Values of the Electrolyte // Chemosensors - 2023. - Т.11. - С. 74.

Запрос на разработку жидкостного мультисенсора, способного к многоцелевому детектированию, очень высок благодаря широкому спектру его потенциальных применений в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, оценке качества сырья, анализе водных ресурсов и т. д. По аналогии с подходом к изготовлению «электронного носа» как газового мультисенсора, комбинация базового жидкостного сенсорного устройства с рецепторными (биоузнающими) слоями позволяет создавать биосенсоры для мультицелевого обнаружения аналитов, используя различные способы: (1) путем модификации устройства или отдельных его компонентов с помощью различных узнающих элементов; (2) путем сбора различных параметров устройства в качестве откликов сенсора; (3) путем построения модели распознавания с одним узнающим элементом, который чувствителен к нескольким аналитам одновременно.

Как было показано в Разделах 3.1 и 3.2, модифицированные аптамерами ОПТЭЗ демонстрируют многообещающие биосенсорные свойства, в т.ч. в реальной биологической жидкости и благодаря своей архитектуре могут быть использованы в качестве платформы для создания на ее основе мультисенсорного устройства с использованием любого из вышеперечисленных подходов. В данном разделе мы выбрали третий путь: модификацию ОПТЭЗ одним узнающим элементом, чувствительным к нескольким аналитам различной природы с четкой их идентификацией, чтобы проверить возможность многоцелевого обнаружения одним устройством [234], как это было реализовано ранее для газовых сенсоров на основе ОПТ [235].

Мы исследовали возможность использования аптамера, способного к конформационному переключению, зависящему от pH, в качестве модельного элемента узнавания, позволяющего использовать ОПТЭЗ как единичное устройство для обнаружения

трех мишеней различной природы. В качестве такого аптамера был выбран ДНК-аптамер BV42 со структурой i-мотив, состоящий из фрагментов i-мотива и двойной спирали и чувствительный к изменениям pH в диапазоне 6,0 - 8,0. Структура i-мотива стабильна при pH < 7,3, при этом взаимодействие между фрагментами i-мотива и двойной спирали обеспечивает способность к специфическому и высокоаффинному распознаванию гемагглютинаина, поверхностного белка вируса гриппа А. За счет этого аптамер специфически узнает вирус гриппа А, образуя при pH 6,0 достаточно стабильный комплекс с константой диссоциации $0,010 \pm 0,002$ пМ только для вируса гриппа А подтипа H7N1. Сродство резко снижается на два порядка, когда i-мотив полностью разворачивается при pH 8,0 [133]. Развернутый i-мотив появляется при pH $\geq 7,3$ и способен связывать ионы Ag^+ , образуя альтернативную конформацию с несколькими парами оснований цитозин- Ag^+ -цитозин. Это взаимодействие имеет явный pH-зависимый характер. Количество мест связывания Ag^+ в аптамере BV42 увеличивается с повышением pH: от 1 места при pH 7,0 до 2 мест при pH 7,3 и, наконец, до 5 мест при pH 8,0. В то же время значения константы диссоциации изменяются, что также указывает на увеличение сродства с повышением pH, а именно 79 мкМ при pH 7,0, 59 мкМ при pH 7,3 и 31 мкМ при pH 8,0 [135]. Таким образом, использование аптамера BV42 в качестве модельного узнающего элемента в ОПТЭЗ-биосенсоре дает возможность обнаруживать аналиты, которые абсолютно различны по своей природе, а именно биологический супрамолекулярный комплекс (вирус гриппа А), неорганический катион Ag^+ и концентрацию ионов H^+ в физиологически значимом диапазоне. Предложенная схема устройства представлена на рисунке 62.

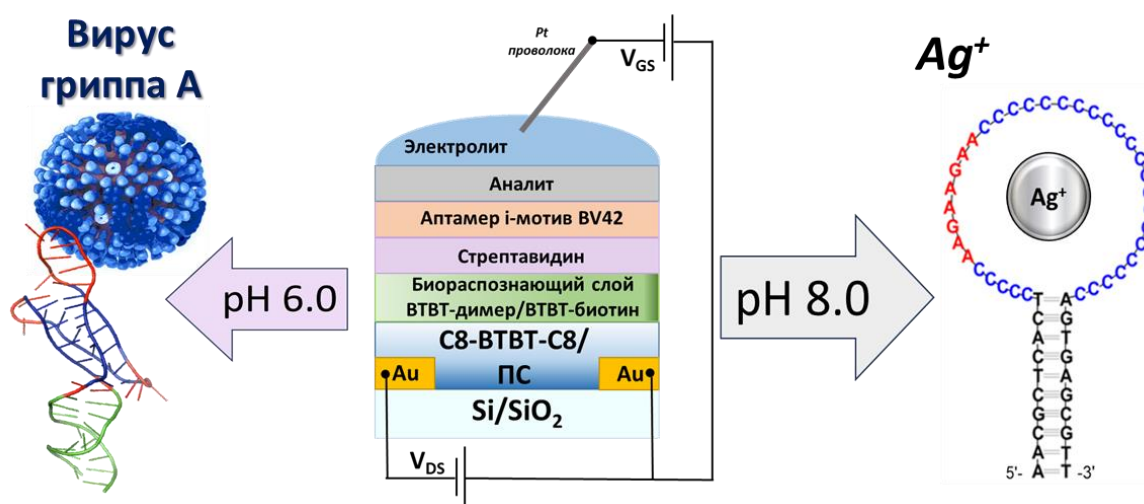


Рисунок 62 –Архитектура и принцип работы ОПТЭЗ-аптасенсора для многоцелевого обнаружения: определение pH, обнаружение вируса гриппа А при pH 6, обнаружение катионов серебра при pH 8

Для проверки сенсорных характеристик i-мотива в архитектуре ОПТЭЗ сначала были проведены последовательные электрические измерения ОПТЭЗ после каждого этапа

модификации, чтобы контролировать процесс модификации и его влияние на электрические характеристики ОПТЭЗ. Соответствующие передаточные кривые представлены на рисунке 63. Из представленных данных видно, что каждый этап формирования следующего слоя влияет на электрические характеристики ОПТЭЗ. Поскольку модификация ОПТЭЗ аптамером представляет собой последний этап перед определением аналита, то параметры модифицированного аптамером ОПТЭЗ были приняты за базовые параметры отклика. Это позволило пренебречь влиянием предыдущих этапов модификации на сенсорный отклик.

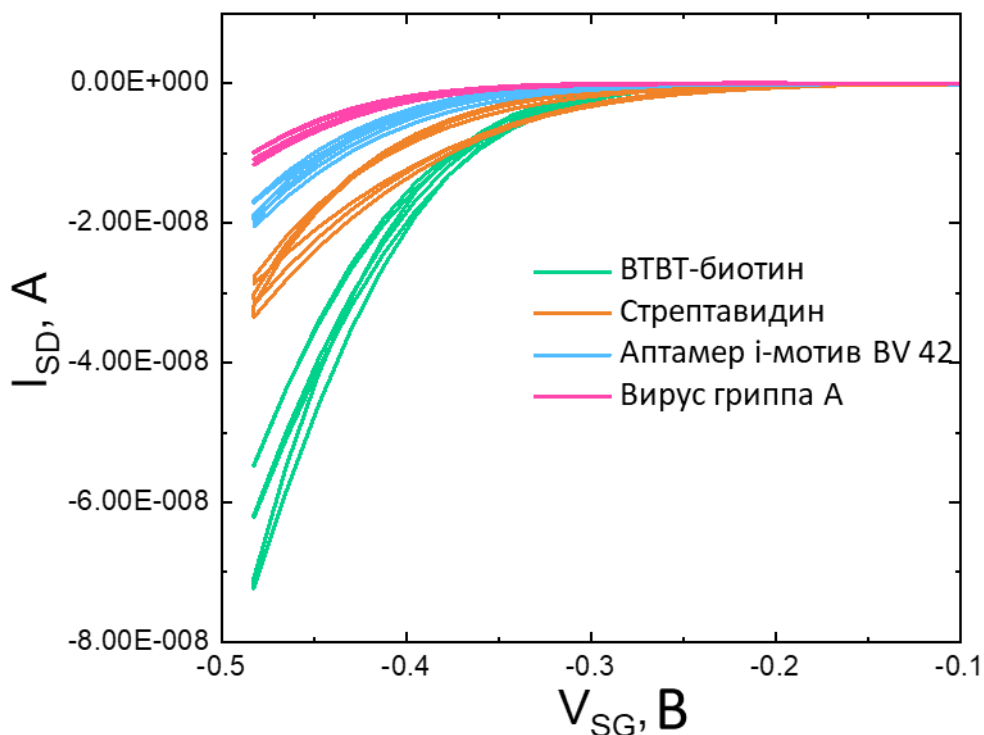


Рисунок 63 – Передаточные характеристики ОПТЭЗ-аптасенсора (для трех устройств), измеренные после каждого этапа модификации поверхности полупроводника слоями **ВТВТ-биотина**, стрептавидина, аптамера i-мотив BV42, вируса гриппа А

Нами было показано, что ОПТЭЗ с полупроводниковым слоем на основе алкилзамещенных производных бензотиенобензотиофена сами по себе чувствительны к изменениям pH. К сожалению, ОПТЭЗ, не содержащие рецепторного и узнающего слоев, продемонстрировали значительную чувствительность к изменению pH только в диапазоне pH от 2,5 до 5,3, в то время как чувствительность в физиологически значимой области при pH от 6,0 до 8,0 оказалась очень слабой (рисунок 64) [210].

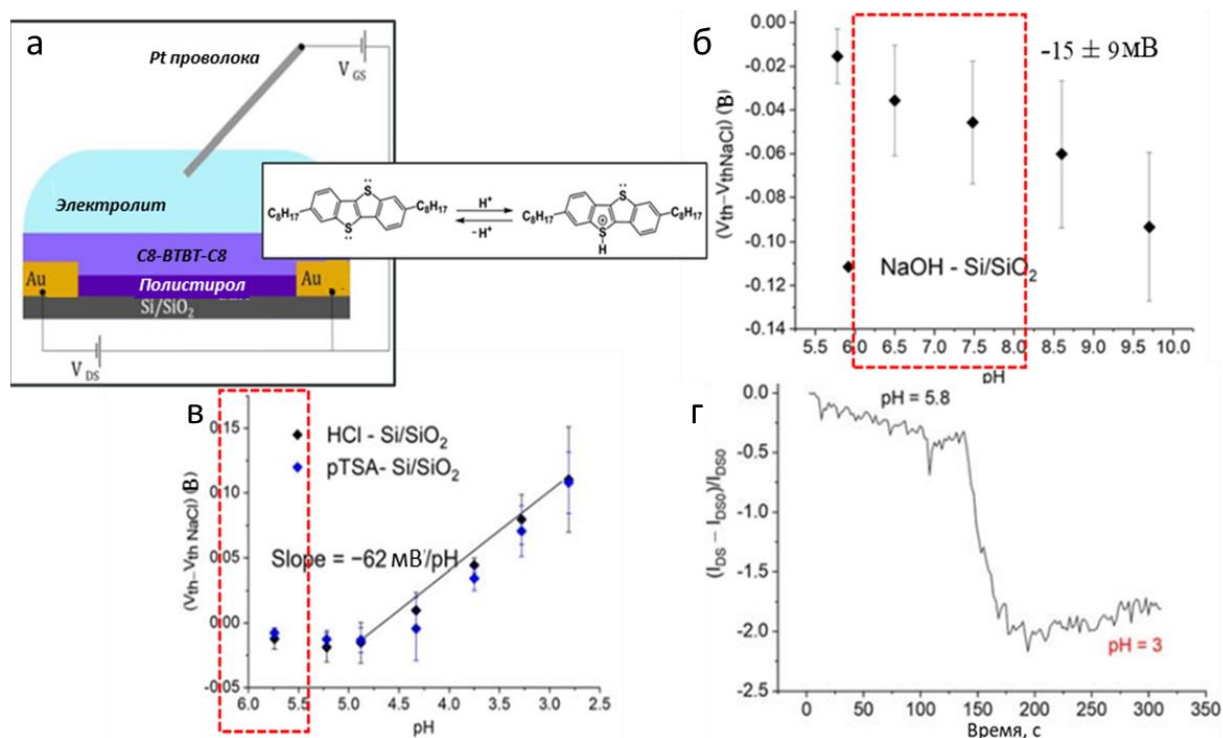


Рисунок 64 – Влияние pH на полупроводниковый слой на основе **C8-BTBT-C8**: архитектура устройства и реакция протонирования-депротонирования **C8-BTBT-C8** (а), сенсорные отклики в различных диапазонах pH (б,в), относительное изменение тока стока-истока устройства при изменении pH от 5,8 до 3,0 (г)

Следует отметить, что охват диапазона pH от 6,0 до 8,0 очень важен для биосенсорики, поскольку именно в этом диапазоне лежит pH почти всех биологических жидкостей. Мы исследовали электрические свойства ОПТЭЗ с полупроводниковой поверхностью **C8-BTBT-C8**, покрытой рецепторным слоем **BTBT-биотина**, затем модифицированным стрептавидином и, наконец, аптамером BV42, в буферных растворах с pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0. Развернутая при pH 8,0 часть i-мотива [133] быстро сворачивается в структуру i-мотива при подкислении до pH ниже 7,0 со временем отклика приблизительно 10-15 секунд. Соответственно, свернутая структура i-мотива подвергается быстрому разворачиванию при подщелачивании. Процессы сворачивания и разворачивания являются многоступенчатыми и имеют разные механизмы, однако, приводят к одинаковым конформациям при одинаковых значениях pH; таким образом, процесс достигает равновесия за короткое время. [135].

Схема измерений pH, реализованная с использованием ОПТЭЗ, модифицированного аптамером BV42, показана на рисунке 65б (вкладка). В качестве параметра сенсорного отклика, как и в предыдущих экспериментах, было выбрано отношение передаточной проводимости ($g_m(pH)/g_{m0}$), где $g_m(pH)$ и g_{m0} — передаточной проводимости в режиме насыщения для измерений pH и для исходного ОПТЭЗ с узнающим слоем, соответственно. Наблюдалось почти полное совпадение коэффициентов наклона калибровочных прямых, измеренных для передаточной проводимости при изменении pH от кислого к щелочному и

наоборот. При переходе от pH 6,0 к pH 8,0 коэффициент наклона составлял -156 ± 3 мВ/pH, а при переходе от pH 8,0 к pH 6,0 - 153 ± 2 мВ/pH (рисунок 65б). Поскольку реорганизация структуры аптамера BV42 в процессе подкисления от pH 8 до pH 6 и ощелачивания от pH 6 до pH 8 приводит к одинаковым конформациям, можно сделать вывод, что зависимость наклона передаточной проводимости от pH в диапазоне pH от 6 до 8 и обратно напрямую соответствует реакции сенсора на pH и не связана с деградацией устройства. Кроме того, это указывает на то, что аптамер, иммобилизованный на поверхности ОПТЭЗ в одной конформации, может обратимо переходить в другую конформацию непосредственно на поверхности устройства, что свидетельствует об успешной интеграции функциональной части узнающего слоя в устройство. Модифицированный i-мотивом ОПТЭЗ-сенсор демонстрирует в 10 раз более высокие отклики в диапазоне pH от 6 до pH 8 по сравнению с немодифицированным ОПТЭЗ на основе **C8-BTBT-C8** и в 8 раз более высокие отклики по сравнению с ОПТЭЗ, модифицированным контрольным нечувствительным к pH аптамером (RBD-1C). Вероятное объяснение заключается в том, что в присутствии чувствительного к pH аптамера изменение pH среды сопровождается не только изменением концентрации ионов H^+ в электролите, но и изменением конформации аптамера с перераспределением заряда на поверхности полупроводника, что приводит к гораздо более значительному влиянию на электрический двойной слой и, следовательно, на электрические характеристики ОПТЭЗ, чем в случае влияния только концентрации ионов H^+ . Что касается ОПТЭЗ с поверхностью, покрытой стрептавидином, он обладает высокой и почти линейной чувствительностью в диапазоне pH 5,5–8,0, как показано на рисунке 65а (красные точки). Однако это не может быть причиной чувствительности к pH модифицированного аптамером ОПТЭЗ, поскольку чувствительность ОПТЭЗ к pH заметно снижается после покрытия слоя стрептавида биотинилированным нечувствительным к pH аптамером (RBD-1C) (рисунок 65а, фиолетовые точки). Это означает, что молекулы аптамера образуют достаточно плотный слой, который не позволяет стрептавидину проявлять свою чувствительность к pH. Это позволяет заключить, что только верхний слой модифицированной поверхности ОПТЭЗ определяет сенсорные свойства устройства.

Таким образом, впервые было продемонстрировано, что ОПТЭЗ-устройство может быть чувствительно к конформации аптамера, более того, pH-зависимый аптамер BV42 может быть использован для точной оценки pH в его физиологическом диапазоне, используя сконструированный ОПТЭЗ-сенсор.

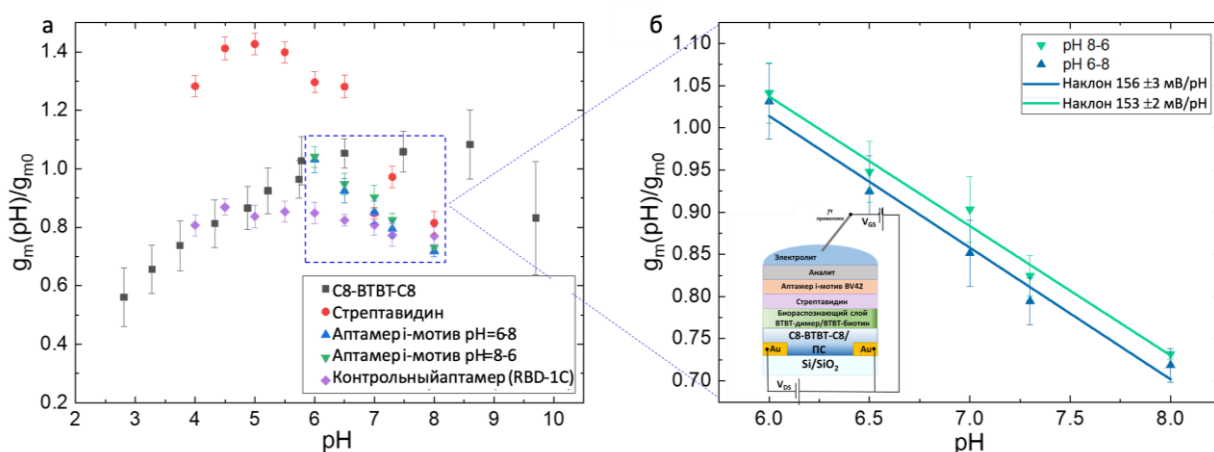


Рисунок 65 – Зависимость от pH передаточной проводимости немодифицированного ОПТЭЗ с поверхностью **C8-BTBT-C8**, ОПТЭЗ с поверхностью, покрытой стрептавидином, ОПТЭЗ, модифицированного аптамером i-мотива, и ОПТЭЗ, модифицированного контрольным аптамером (RBD 1C) (а); зависимость от pH характеристик ОПТЭЗ, модифицированного аптамером i-мотив, в диапазоне pH от 6 до pH 8 в прямом и обратном направлениях (б), измеренная как стандартизированная передаточная проводимость в режиме насыщения. Схема измерений pH приведена на вставке к (б)

Важным свойством узнающего элемента i-мотив является его активность, зависящая от pH. Свернутый аптамер i-мотив связывает гемагглютинин вируса гриппа А, тогда как развернутый i-мотив связывает ионы Ag^+ . Нами была измерена чувствительность модифицированного i-мотивом ОПТЭЗ к различным концентрациям вируса гриппа А при разных значениях pH, а также проведено сравнение с контрольными экспериментами с другим, неспецифичным к вирусу гриппа А аптамером (RBD-1C) или другим неспецифичным к аптамеру i-мотив вирусом (вирус болезни Ньюкасла). Схемы ОПТЭЗ-устройств, использованных в этих экспериментах, а также сенсорные отклики устройств на вирусы приведены на рисунке 67а. В качестве параметра отклика, как и ранее, была выбрана нормированная передаточная проводимость $(g_m(apt)/g_m(vir))$ и $(g_m(apt)-g_m(vir))/g_m(biotin)$, где $g_m(biotin)$, $g_m(apt)$ и $g_m(vir)$ — передаточная проводимость в насыщенном режиме при измерении исходного биотинилированного рецепторного слоя; ОПТЭЗ, модифицированного аптамером; ОПТЭЗ после иммобилизации вируса, соответственно.

Все исследованные устройства продемонстрировали воспроизводимые электрические характеристики и очень низкую деградацию в процессе измерений. Согласно представленным на рисунке 66 данным, была подтверждена специфичность реакции изготовленного ОПТЭЗ-аптасенсора на целевой анализ, вирус гриппа А.

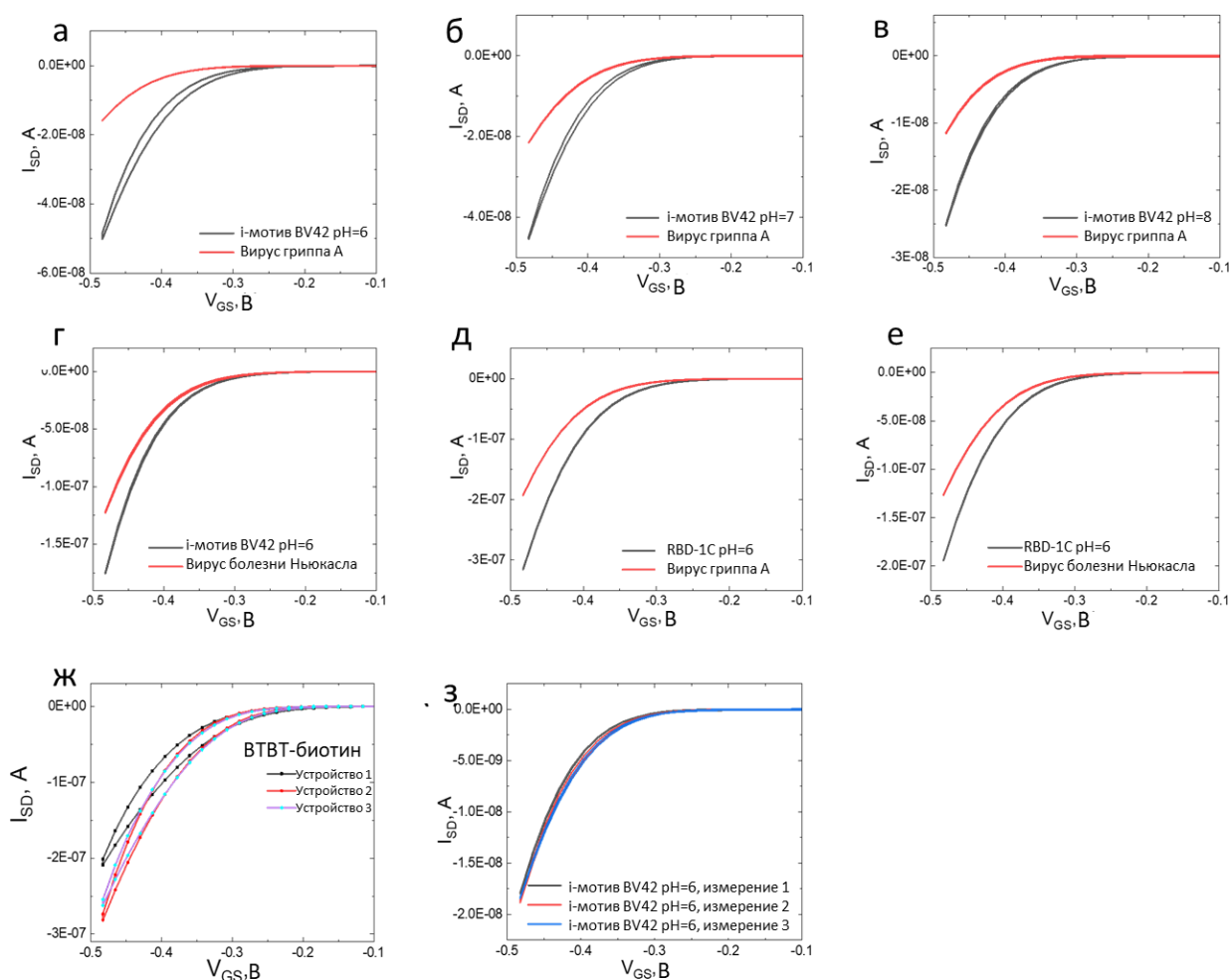


Рисунок 66 – Передаточные характеристики целевых и контрольных измерений по обнаружению вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла различными ОПТЭЗ-аптасенсорами при разных значениях pH: (а) аптамер i-мотив BV42 при pH=6, вирус гриппа А; (б) аптамер i-мотив BV42 при pH=7, вирус гриппа А; (в) аптамер i-мотив BV42 при pH=8, вирус гриппа А; (г) аптамер i-мотив BV42 при pH=6, вирус болезни Ньюкасла; (д) аптамер RBD-1C при pH=6, вирус гриппа А; (е) аптамер RBD-1C при pH=6, вирус болезни Ньюкасла. Воспроизводимость электрических характеристик ОПТЭЗ-устройств (ж). Деградация слоя аптамера в процессе последовательных измерений (з)

Аптамер BV42 со структурой i-мотив связывается с вирусом гриппа А при значениях pH 6,0; 7,0; 8,0, при этом наиболее сильный отклик наблюдается при pH 6,0, как и ожидалось. В то же время BV42 не связывается с вирусом болезни Ньюкасла даже в полностью свернутом состоянии при pH 6,0. Сравнение с устройствами, модифицированными аптамером RBD-1C, специфичным к вирусу SARS-CoV-2, также не выявило каких-либо существенных изменений проводимости ни для вируса гриппа А, ни для вируса болезни Ньюкасла (рисунок 67а). Таким образом, вызванное вирусом гриппа А увеличение передаточной проводимости в исследованном диапазоне концентраций является результатом специфичных взаимодействий аналита и активной поверхности устройства.

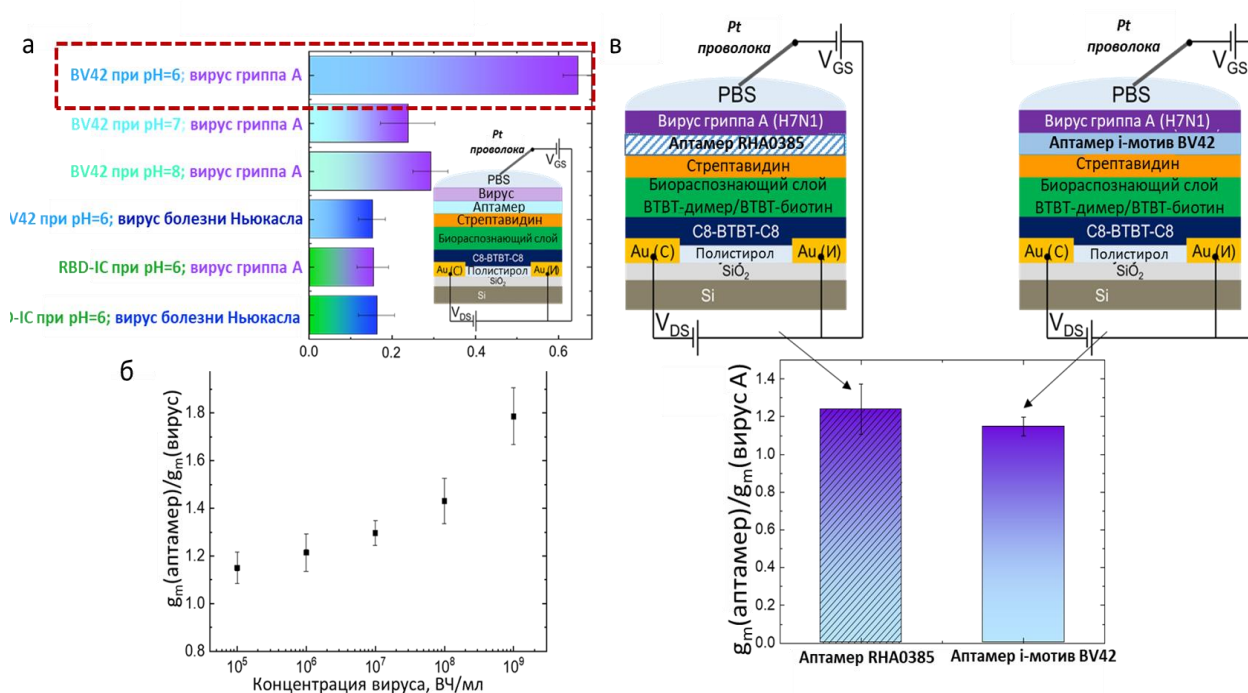


Рисунок 67 – (а) Схема ОПТЭЗ-аптасенсора и контрольных измерений для обнаружения вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла с различными аптамерами при разных значениях pH. (б) Обнаружение вируса гриппа А с помощью ОПТЭЗ-аптасенсора на основе аптамера BV42 в зависимости от концентрации вируса при pH 6. (в) Сравнение откликов ОПТЭЗ-сенсоров, модифицированных аптамерами RHA0385 и BV42, на вирус гриппа А с соответствующими схемами устройств

Отклики модифицированного аптамером i-мотив ОПТЭЗ на вирус гриппа А в концентрациях $6 \times 10^4 \div 6 \times 10^8$ ВЧ/мл приведены на рисунке 67б. Биоузнавание с помощью аптамера i-мотива BV42 обеспечивает предел обнаружения, равный $6 \cdot 10^4$ ВЧ/мл. Предел обнаружения (по результатам 10 повторений) был рассчитан на основе линейной регрессии интенсивности сигнала в зависимости от логарифма концентрации вируса гриппа А (использовали восходящая часть кривой). Предел обнаружения был оценен как концентрация вируса, которая увеличивала величину относительной передаточной проводимости на три стандартных отклонения по сравнению с этой величиной в контрольном образце.

Чтобы сравнить сенсорные свойства аптамера i-мотив по отношению к вирусу гриппа А с сенсорными свойствами аптамера RHA385, которые мы исследовали ранее в той же архитектуре ОПТЭЗ, провели измерения для обоих аптамеров в одинаковых условиях. Схемы ОПТЭЗ-устройств, используемых для обнаружения вируса гриппа А, а также их отклики на концентрацию вируса 6×10^6 ВЧ/мл показаны на рисунке 67в. В пределах погрешности отклики обоих ОПТЭЗ на вирус гриппа А совпадают. Это означает, что аптамер i-мотив в качестве узнающего элемента демонстрирует в оптимальных условиях при pH 6,0 ту же чувствительность в ОПТЭЗ-биосенсоре, что и аптамер RHA0385.

Свернутый аптамер i-мотив (в конформации при pH 6) не имеет сродства к катионам Ag^+ , поскольку катионы Ag^+ не способны вытеснить протоны H^+ из структуры i-мотива, так как константы диссоциации $\text{C-Ag}^+-\text{C}$ на два порядка выше, чем $\text{C-H}^+-\text{C}$ [135]. Исследования частично и полностью развернутой части i-мотива (конформации при pH 7,3 и 8,0 соответственно), проведенные в вышеуказанной работе, показали, что внутри структуры BV42 имеется несколько неэквивалентных сайтов связывания Ag^+ . Поскольку щелочной pH 8,0 может вызвать деградацию слоя органического полупроводника, а следовательно, привести к быстрой деградации ОПТЭЗ, для измерений был выбран pH 7,3, как более благоприятный для ОПТЭЗ-устройств. Эксперименты по обнаружению катионов Ag^+ с помощью модифицированного аптамером BV42 ОПТЭЗ проводили при физиологической ионной силе в фосфатно-солевом буфере, поскольку аптамер BV42 не способен связывать Ag^+ в воде из-за необходимости ионной силы для стабилизации дуплекса с парами $\text{C-Ag}^+-\text{C}$, как было установлено в [135].

Поскольку результаты измерений кинетики в остановленном потоке, проведенные д.х.н. Завьяловой и А.К.Кешек в МГУ имени М.В.Ломоносова, показали, что аптамер BV42 очень быстро меняет конформацию с катионом серебра при щелочном pH раствора, было решено проверить, сколько времени потребуется для реакции аптамера с катионом серебра на поверхности устройства. Для этого были измерены 12 последовательных передаточных кривых ОПТЭЗ-устройства в 40-нМ растворе AgNO_3 . Все кривые практически совпадают с первой, измеренной через 23 секунды после нанесения капли раствора AgNO_3 на поверхность ОПТЭЗ (рисунок 68а). Эти измерения показывают электрические характеристики устройства каждые 23 секунды в диапазоне 23÷276 секунд, поэтому полученные данные означают, что насыщение отклика на аналит проявляется очень быстро – менее чем за 23 секунды. Наблюдаемое изменение передаточной проводимости в течение как минимум 5 минут после начала измерений не превышало 2% (рисунок 68б). Таким образом, полученные результаты демонстрируют эксплуатационную стабильность работы и отклика устройства. Чувствительность аптамера i-мотив к катионам серебра при pH 7,3 на поверхности ОПТЭЗ приведена на рисунке 68в (черные точки), рассчитанный предел обнаружения составил 6 нМ. Контрольные измерения проводили с использованием двух эталонных образцов: аптамера i-мотив при pH 6,3 и контрольного аптамера (RNA0385) при pH 6,0. Результаты показаны на рисунке 68в (красные и синие точки, соответственно). Отклик устройства с аптамером i-мотив при pH 6,3 наблюдался только при высоких концентрациях катионов Ag^+ (640 нМ и выше), в то время как использование RNA0385 в качестве контрольного аптамера не показало никакой реакции во всем диапазоне концентраций. Эти данные подтверждают, что сборка аптамера на

поверхности ОПТЭЗ происходит при pH 7,3 и позволяет определять концентрацию катионов Ag^+ в диапазоне 6 нМ÷1250 нМ с чувствительностью $0,056 \pm 0,001 \text{ нМ}^{-1}$.

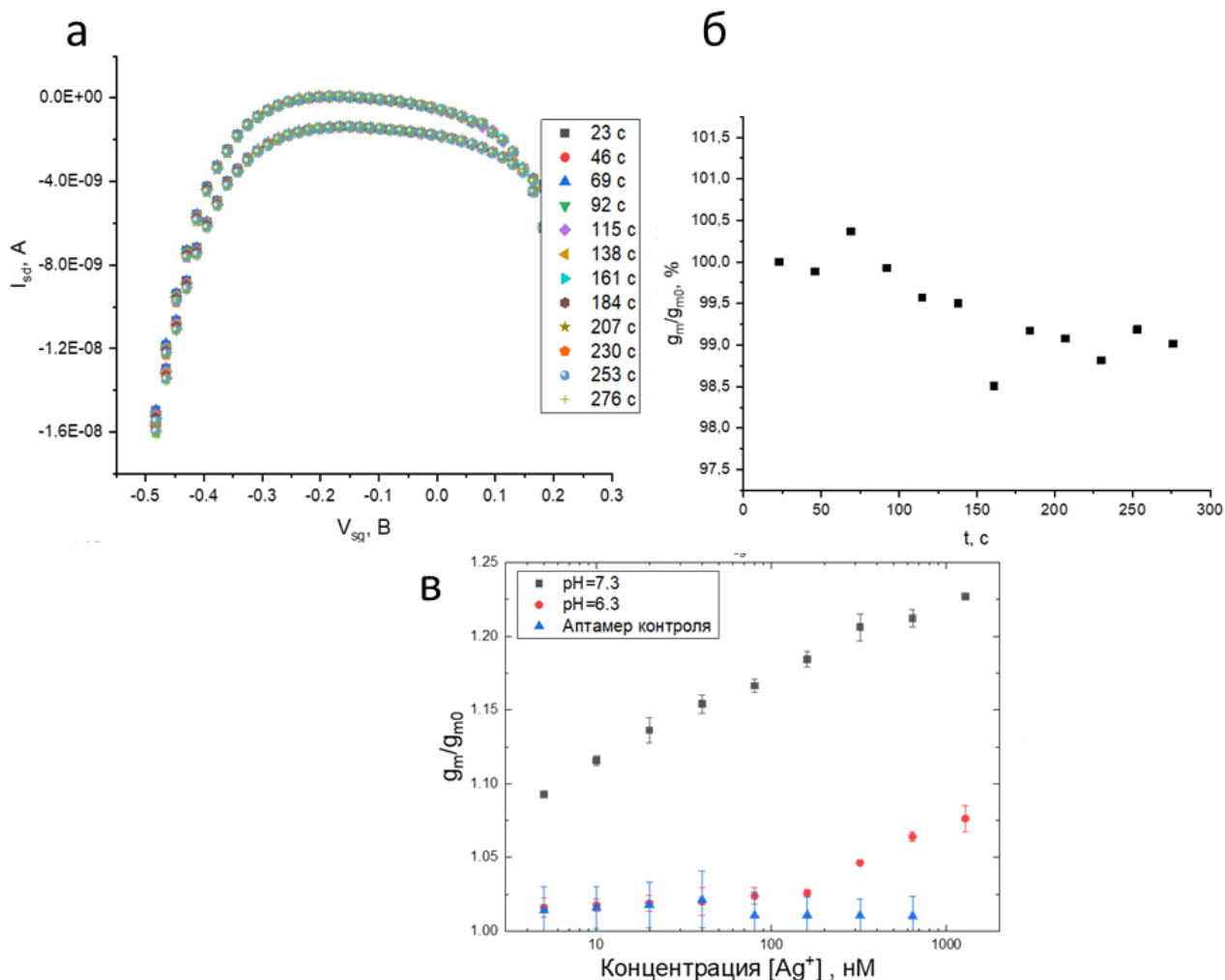


Рисунок 68 – Обнаружение катионов Ag^+ с помощью ОПТЭЗ-аптасенсора на основе аптамера i-мотив при pH 7,3: (а) 12 последовательных передаточных кривых устройства, измеренных в растворе AgNO_3 концентрацией 40 нМ одна за другой. (б) Зависимость нормированной передаточной проводимости (g_m/g_{m0} (%), где g_m — передаточная проводимость последующего измерения каждые 14 секунд, g_{m0} — передаточная проводимость первого измерения) от времени. (в) Чувствительность устройства с аптамером i-мотив к катионам Ag^+ при pH 7,3 (черные точки) и pH 6,3 (красные точки) и контрольный эксперимент с нечувствительным к Ag^+ аптамером RNA0385 (синие точки)

Морфологию поверхности ОПТЭЗ-аптасенсоров (**C8-ВТВТ-C8/PS – ВТВТ-биотин** – стрептавидин) с аптамером BV42, инкубированным вирусом гриппа А, после измерения pH и после измерения Ag^+ или с аптамером RNA0385, инкубированным вирусом гриппа А, контролировали с помощью поляризационной оптической (рисунок 70) и атомно-силовой (рисунок 69) микроскопии. Изображения демонстрируют очень низкую степень деградации поверхностей сенсоров после измерений.

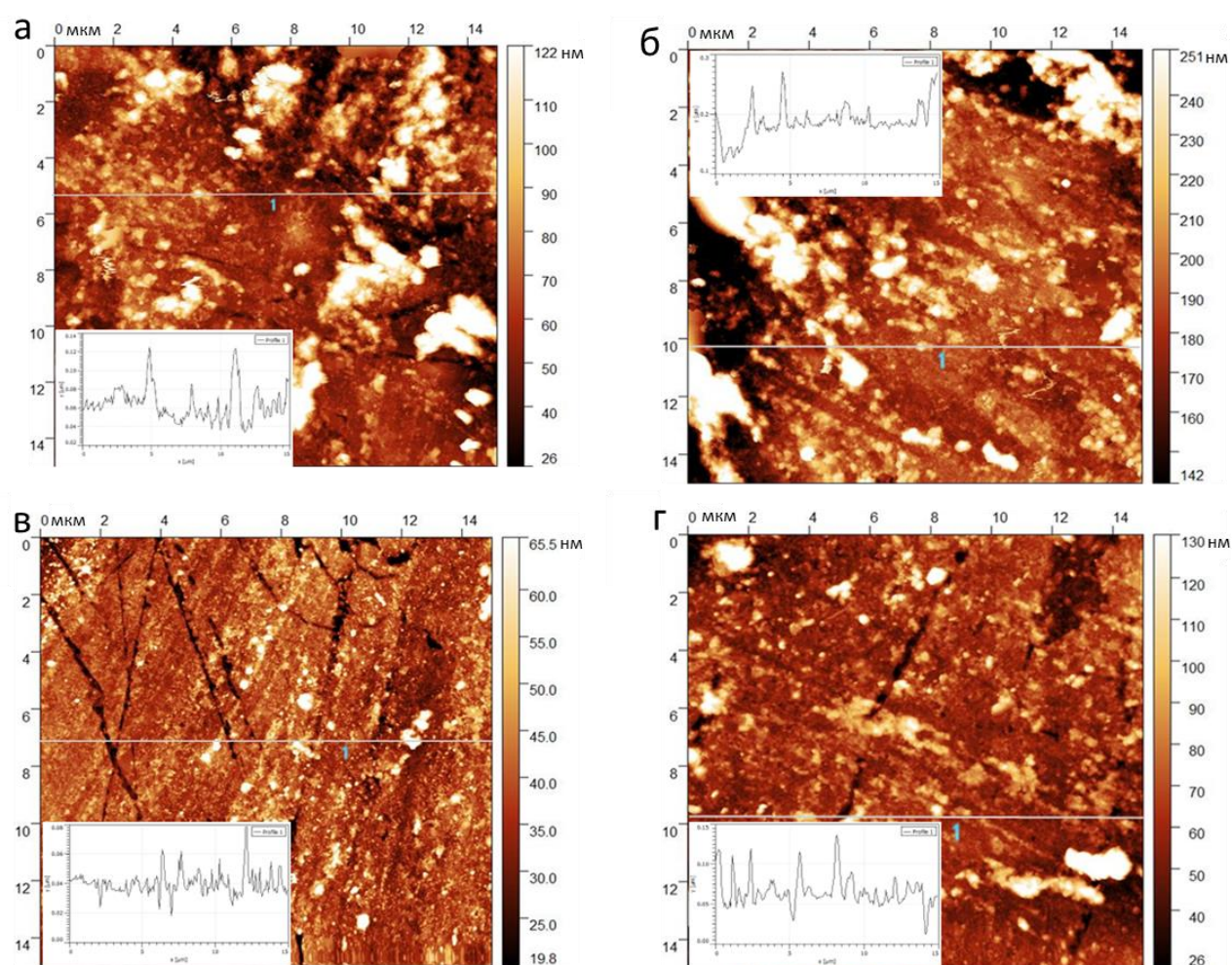


Рисунок 69 – АСМ-изображения морфологии и профили поперечного сечения поверхностей ОПТЭЗ-сенсоров (**С8-ВТВТ-С8/PS – ВТВТ-биотин** – стрептавидин) с разными аптамерами, обработанными разными аналитами: (а) аптамер BV42 с вирусом гриппа А, (б) аптамер RNA0385 с вирусом гриппа А, (в) аптамер BV42 после измерения pH, (г) аптамер BV42 после измерения Ag^+

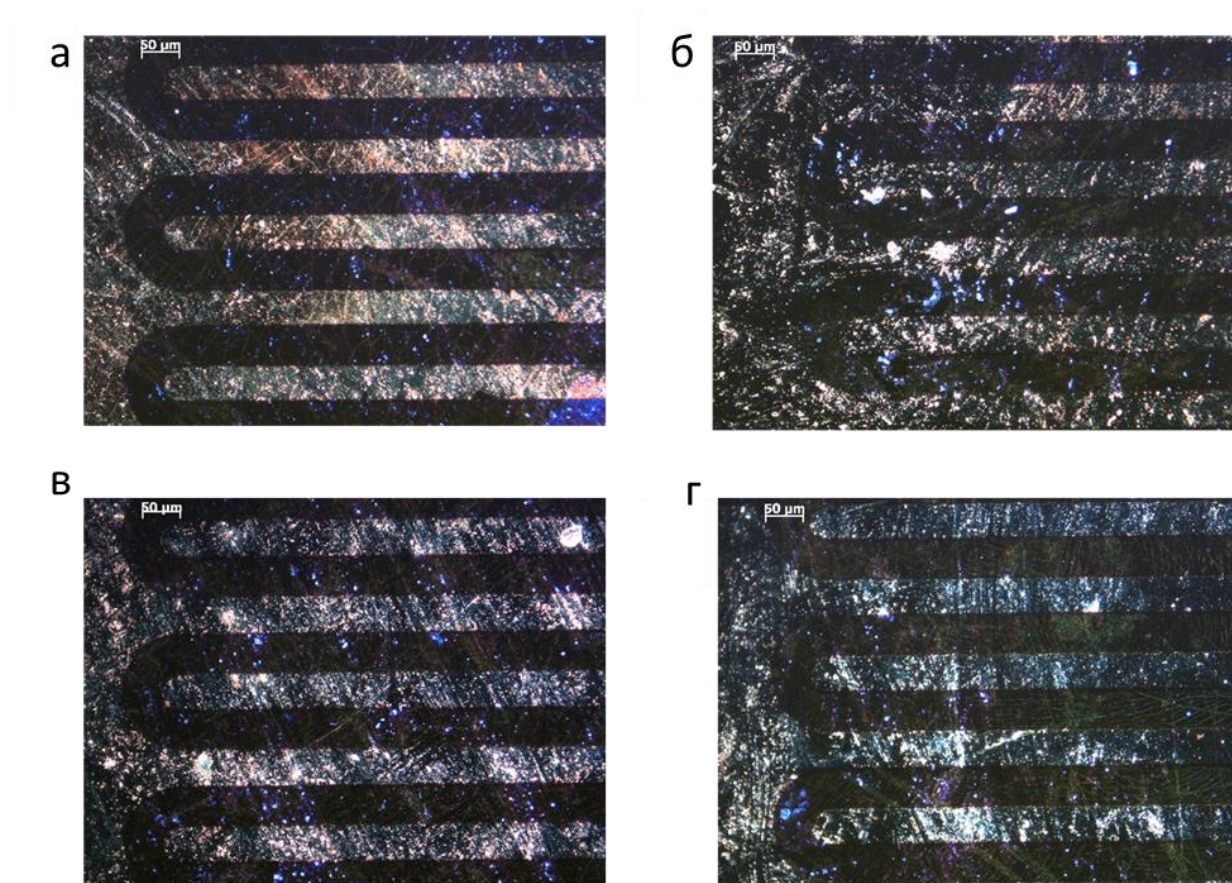


Рисунок 70 – Изображения поверхности ОПТЭЗ-сенсора (**С8-ВТВТ-С8/PS – ВТВТ-биотин – стрептавидин**), полученные методом поляризационной оптической микроскопии (ПОМ), с разными аптамерами, обработанными разными аналитами: (а) аптамер BV42 с вирусом гриппа А, (б) аптамер RHA0385 с вирусом гриппа А, (в) аптамер BV42 после измерения pH, (г) аптамер BV42 после измерения Ag^+

Для установления механизма работы ОПТЭЗ-аптасенсора было исследовано влияние длины и конформации аптамера на значение передаточной проводимости устройств. Для этой цели были выбраны различные олигонуклеотиды разной длины. Стрептавидиновый слой ОПТЭЗ был модифицирован биотинилированным аптамером i-мотив, BV42 длиной 55 нуклеотидов, аптамером RHA0385 длиной 28 нуклеотидов, комплементарной последовательностью аптамера RHA0385 - compRHA0385 длиной 28 нуклеотидов и двойной спиралью, образованной между RHA0385 и compRHA0385 (в сумме 56 нуклеотидов), как показано на рисунке 71.

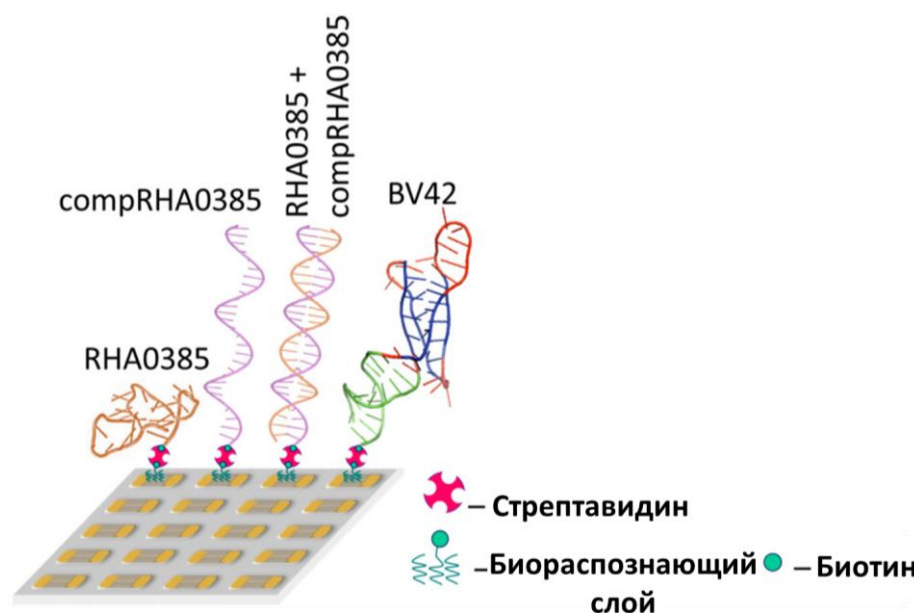


Рисунок 71 – Схема эксперимента, раскрывающего механизм чувствительности ОПТЭЗ-аптасенсора с использованием модификации аптамерами различной длины

Были исследованы электрические характеристики вышеперечисленных четырех типов модифицированных устройств. Для корректного сравнения данных использовали нормированное значение отклика устройств: $g_m(\text{Apt}) - g_m(\text{SA}) / g_m(\text{biotin})$, где $g_m(\text{Apt})$, $g_m(\text{SA})$, $g_m(\text{biotin})$ – передаточные проводимости ОПТЭЗ с верхними слоями соответствующего аптамера, стрептавидаина или биотина, соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Электрические характеристики ОПТЭЗ-устройств, модифицированных олигонуклеотидами различной длины и конформации.

Аптамер, инкубированный на поверхность ОПТЭЗ поверх стрептавидаина	Отклик устройства ($g_m(\text{Apt}) - g_m(\text{CA}) / g_m(\text{биотин})$)
compRNA0385 (разобранный, 28 нуклеотидов)	0.19 ± 0.05
RHA0385 (собранный G-квадруплекс, 28 нуклеотидов)	0.11 ± 0.06
Двойная спираль, полученная из compRNA0385 и RHA0385, 56 нуклеотидов в сумме (рассчитано)	0.30 ± 0.05
Двойная спираль, полученная из compRNA0385 и RHA0385, 56 нуклеотидов в сумме (экспериментально)	0.29 ± 0.06
BV42 при pH=6 (собранный полностью, 55 нуклеотидов)	0.24 ± 0.05
BV42 при pH=8 (собранный частично, 55 нуклеотидов)	0.10 ± 0.01

Структура аптамера i-мотив BV42 окружена комплементарными нитями, образующими дуплексный модуль с интерфейсом i-мотив-дуплекс. Комбинация аптамеров compRNA0385 с RNA0385 приводит к образованию двойной спирали почти такой же длины, как у аптамера BV42. Оба варианта имеют практически одинаковый заряд. Вычисленная сумма величин откликов ОПТЭЗ, модифицированных аптамерами compRNA0385 и RNA0385, в пределах погрешности равна экспериментально полученному отклику ОПТЭЗ, модифицированному двойной спиралью, состоящей из аптамеров compRNA0385 и RNA0385. Это позволяет предположить, что отклик устройства напрямую зависит от электрического заряда его поверхности. В то же время наблюдается приблизительно 20%-я разница между откликами ОПТЭЗ с идеальной двойной спиралью, состоящей из аптамеров compRNA0385 и RNA0385, и i-мотивом BV42, свернутым при pH=6. Этот результат можно интерпретировать как частичную компенсацию заряда протонами, присутствующими в структуре BV42, содержащей 10 H⁺ и/или влиянием конформации олигонуклеотида на отклик устройства. Однако, отклики ОПТЭЗ, модифицированного свернутыми и развернутыми структурами, различаются примерно в два раза при сравнении аптамера RNA0385 (свернутая структура G-квадруплекса) с аптамером compRNA0385 (развернутая ДНК), а также BV42 при pH 6,0 (полностью свернутая структура) и 8,0 (полностью развернутая структура, двойная спираль сохранена). Эти данные указывают на то, что ОПТЭЗ-устройство чувствительно к конформационным особенностям аптамера, вероятно, из-за интерференции заряда. В частности, в случае аптамера i-мотив это приводит к возможности различения трех аналитов различной природы: pH, ионов Ag⁺, вируса гриппа А. С учетом выявленных закономерностей этот список можно дополнительно расширить путем рационального проектирования узнающих элементов на основе ДНК, используемых в качестве рецепторов в структуре ОПТЭЗ.

Полученные данные подтвердили, что аптамер структуры i-мотив является мощным инструментом для функционализации ОПТЭЗ. Биотинилированная поверхность исходного устройства предоставляет возможность создания сенсоров для многоцелевого определения аналитов путем модификации поверхности устройства различными элементами распознавания – белками, аптамерами, антителами и т. д. Однако способность аптамера i-мотив изменять свою конформацию в зависимости от pH позволяет построить многопараметрическую модель распознавания с одним узнающим элементом, чувствительным к нескольким аналитам одновременно – pH, ионам Ag⁺, вирусу гриппа А (рисунок 72). Нами было предложено единое модельное устройство, позволяющее различать эти аналиты в рамках одного анализа. Пластина с 20 устройствами ОПТЭЗ была разделена на четыре зоны детектирования, каждая из которых состоит из 5 идентичных устройств и

предназначена для обнаружения одного из трех аналитов. Первая область покрыта аптамером i-мотив BV42 в 0,1 М NaCl для определения pH; вторая область покрыта развернутым аптамером BV42 для обнаружения ионов Ag^+ в PBS при pH 7,3; третий слой покрыт свернутым аптамером BV42 для обнаружения вируса гриппа А в PBS при pH 6,0, а четвертый слой покрыт контрольным аптамером RHA0385 для обнаружения вируса гриппа А (рисунок 72а).

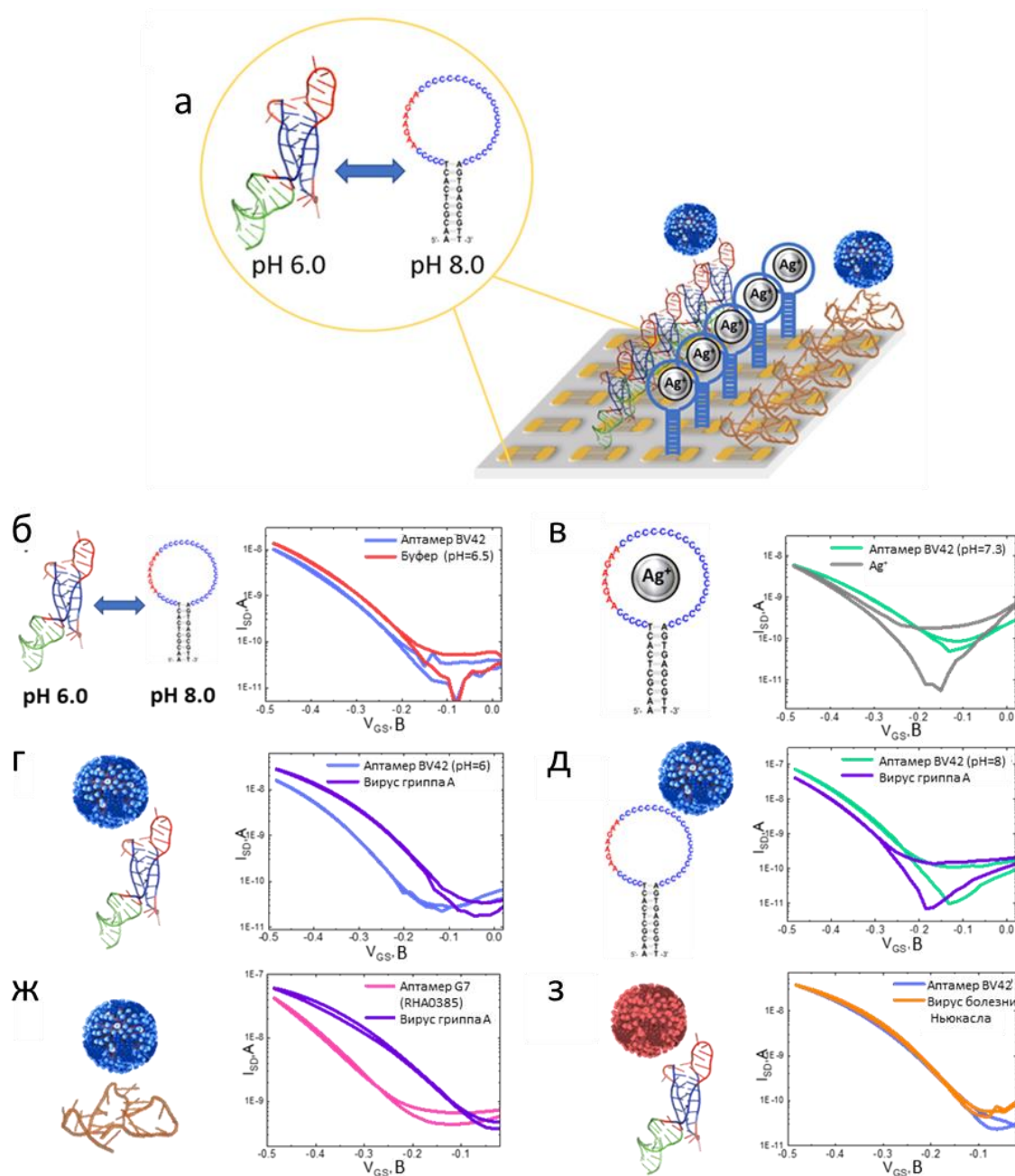


Рисунок 72 – Принцип работы ОПТЭЗ-мультисенсора (а): (б) определение pH с помощью аптамера BV42, (в) определение катионов серебра при pH 7,3 с помощью аптамера BV42, (г) обнаружение вируса гриппа А при pH 6,0 с помощью аптамера BV42, (д) контроль – обнаружение вируса гриппа А при pH 8,0 с помощью аптамера BV42, (ж) обнаружение вируса гриппа А с помощью аптамера RHA0385, (з) контроль – обнаружение вируса болезни Ньюкасла с помощью аптамера BV42

Процесс интерпретации данных, полученных с помощью предложенного мультисенсора, довольно прост: тестовый жидкий образец, предположительно содержащий

ионы Ag^+ или частицы вируса гриппа А, помещается в ячейку с мультисенсорным чипом и одновременно измеряется всеми 20 устройствами. Затем отклики устройств внутри каждой области обнаружения усредняются по медианному значению для отбрасывания выбросов, а затем сравниваются с откликами других областей обнаружения. Если наибольший отклик получен от устройств второй области, это соответствует присутствию ионов Ag^+ , тогда как наибольший отклик от третьей области соответствует присутствию вируса гриппа А. Случай отсутствия отклика как от второй, так и от третьей области позволяет предсказать отсутствие Ag^+ и вируса гриппа А в тестовом образце и требует контроля работы устройства в целом путем проверки отклика первой области, который должен быть зарегистрирован, даже если образец не содержит обоих целевых веществ.

Для демонстрации возможностей обнаружения сенсорного чипа были проведены соответствующие измерения. Результаты, представленные графиком отклика сенсора с аптамером BV42 при $\text{pH}=6$ по сравнению с откликом сенсора с аптамером BV42 при $\text{pH}=7,3$, показаны на рисунке 73. Хорошо видно, что измерения вируса А и Ag^+ формируют свои собственные области на графике. Таким образом, если в образце присутствует вирус гриппа А, то можно ожидать, что новая точка будет расположена в области вируса гриппа А (оранжевый цвет), а его концентрацию можно рассчитать, используя соответствующую кривую зависимости отклика от концентрации для BV42 при $\text{pH}=6$ (рисунок 73). С другой стороны, присутствие ионов серебра в образце должно привести к появлению новой точки в темно-синей области. Соответствующую концентрацию ионов можно найти из кривой зависимости отклика от концентрации для BV42 при $\text{pH}=7,3$ (рисунок 73). Если в образце нет частиц вируса А или ионов серебра, новая точка должна появиться где-то между оранжевой и темно-синей областями – например, розовой при изменении pH .

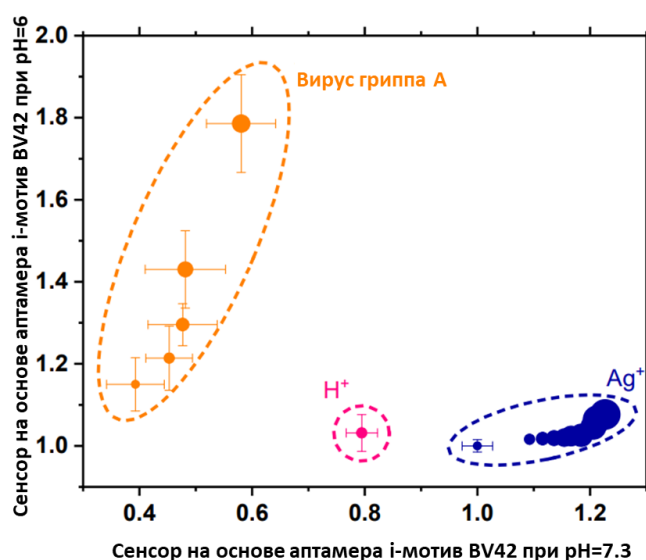


Рисунок 73 – Обнаружение разных аналитов с помощью одного чипа при разных pH

Для демонстрации клинической применимости разработанного ОПТЭЗ-мультисенсора были проведены эксперименты по определению стабильности его работы с использованием слюны здоровых добровольцев, а также коммерчески доступной плазмы крови.

Все устройства демонстрируют высокую эксплуатационную стабильность в течение более чем часа в слюне и более чем полчаса в плазме. Наблюдаемая разница в сроке службы устройств в различных биологических жидкостях легко объясняется разницей в их составе, поскольку плазма содержит больше белков, чем слюна, однако срок службы устройства в обеих жидкостях гарантированно достаточен для обнаружения сенсорного отклика. Зависимости нормированной передаточной проводимости (g_m/g_{m0}) от времени, наблюдаемые для устройств, работающих в слюне и плазме, демонстрируют стабильность отклика устройства и представлены на рисунке 74 а и б соответственно.

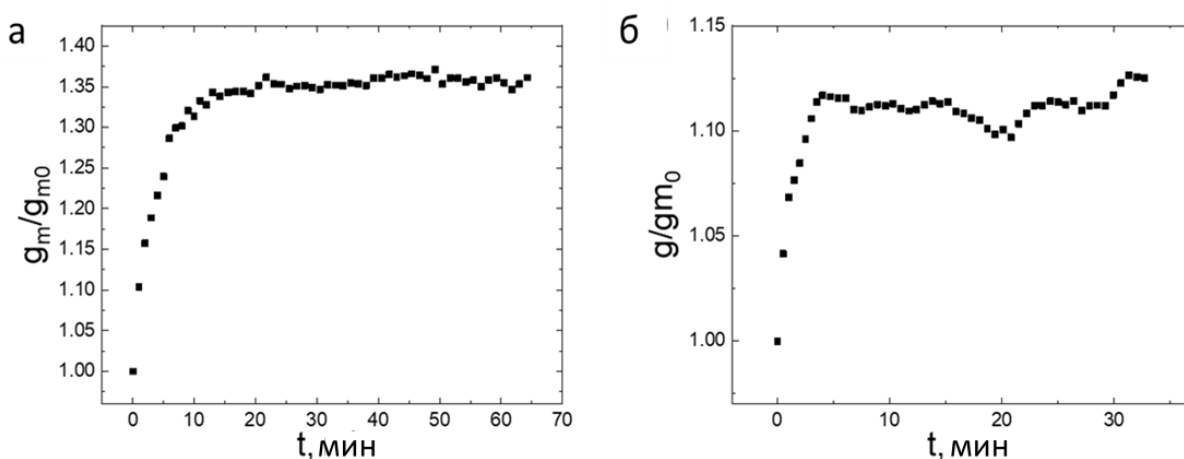


Рисунок 74 – Зависимость нормированной передаточной проводимости (g_m/g_{m0}) от времени, наблюдаемая для устройств, работающих в (а) слюне и (б) плазме, где g_m — передаточная проводимость последующего измерения каждые 60 с, а g_{m0} — передаточная проводимость первого измерения начального ОПТЭЗ

Отклик ОПТЭЗ-мультисенсора на вирус гриппа А в концентрации $6 \cdot 10^6$ ВЧ/мл и вирус болезни Ньюкасла в концентрации $5 \cdot 10^6$ ВЧ/мл в модельных образцах, содержащих вирус, растворенный в PBS, а также в реальных образцах биологических жидкостей, содержащих вирус, растворенный в слюне и плазме, сравнивали с использованием параметра отклика $((g(\text{Apt})-g(\text{Vir}))/g(\text{biotin}))$ (рисунок 75). Влияние биологической среды на отклик устройства было незначительным, и отклики были практически одинаковыми в модельной среде (PBS) и слюне и немного ниже в плазме. В то же время следует подчеркнуть, что разница между результатами экспериментов с целевым вирусом и контрольных экспериментов с вирусом болезни Ньюкасла была ниже в случае реальных образцов, вероятно, из-за наличия мешающих компонентов в биологических жидкостях и того, что отношение сигнал/шум в реальных образцах было в два раза ниже, чем в фосфатно-солевом буфере (PBS), однако достигнутой

разницы откликов достаточно, чтобы четко различать целевые и контрольные образцы. Для демонстрации этого был проведен анализ разделимости с использованием функции TTest, которая возвращает р-значения для двух заданных массивов. Полученные значения указывают на разделимость между целевым вирусом гриппа А и контрольным вирусом болезни Ньюкасла в слюне (р-значение = 0,0009) и плазме (р-значение = 0,02) при стандартном уровне значимости 5%. Для PBS уровень значимости может быть более строгим — до 0,1% (р-значение = $3 \cdot 10^{-7}$).

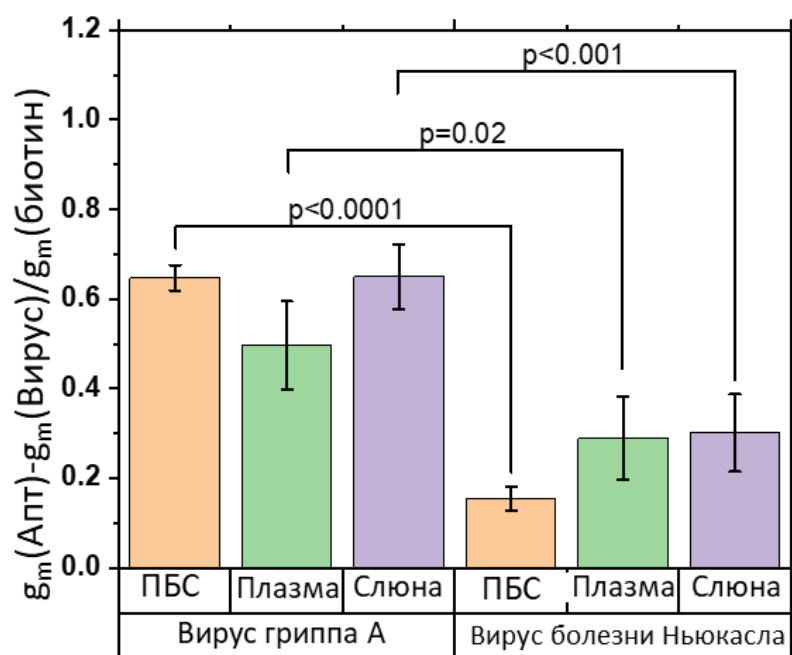


Рисунок 75 – Отклик ОПТЭЗ-сенсора на целевой и контрольный вирусы в реальных образцах биологических жидкостей (слюна и плазма крови) в сравнении с модельным образцом (PBS)

Полученные результаты наглядно демонстрируют применимость разработанного ОПТЭЗ-мультисенсора для обнаружения в реальных образцах биологических жидкостей вирусной нагрузки, типичной для пациентов с гриппом.

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что, использование аптамера с конформационным переключателем, зависящим от рН, в качестве узнающего элемента позволяет применять органический полевой транзистор с электролитным затвором в качестве единственного элемента для обнаружения трех мишеней различной природы. Установлено, что аптамер со структурой i-мотив обеспечивает рецепторный слой ОПТЭЗ с возможностью обнаружения нескольких мишеней без ухудшения электрических характеристик устройства. Было показано, что изготовленное ОПТЭЗ-устройство чувствительно к конформации аптамера. Сенсор чувствителен к изменениям рН в диапазоне рН от 6 до 8 благодаря Н⁺-зависимой сборке структуры ДНК с i-мотивом. Измеренная чувствительность составляет 156 мВ/рН, что в 10 раз выше, чем у ОПТЭЗ на основе С8-ВТВТ-С8, не содержащего аптамера. В условиях, неблагоприятных для сборки i-мотива (рН > 7,3),

развернутая петля цитозина образует комплекс с ионами Ag^+ за счет новой конформации. В условиях, благоприятных для сборки i-мотива ($pH < 7,3$), свернутый i-мотив связывается с вирусом гриппа А. Отклики ОПТЭЗ для этих трех аналитов лежат в разных диапазонах, что позволяет их четко различать. Применимость разработанного устройства в реальных условиях была доказана для биологических жидкостей, таких как слюна и плазма крови, с вирусной нагрузкой, типичной для пациентов с гриппом. Впервые реализована концепция многоцелевого обнаружения одним чипом на основе ОПТЭЗ с одним узнающим элементом. Этот пример узнающего элемента модели, обладающего комбинированными свойствами и интегрированного в архитектуру ОПТЭЗ, открывает путь к управлению свойствами биосенсоров на основе ОПТЭЗ и, в будущем, к разработке мультисенсоров на платформе ОПТЭЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомендации по выбору материалов полупроводникового, рецепторного и биоузнающего слоев, а также методов изготовления ОПТЭЗ-биосенсоров для достижения требуемых сенсорных характеристик

Одним из ключевых результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, является обнаруженная фундаментальная взаимосвязь между способами формирования рецепторных и биоузнающих слоев ОПТЭЗ-биосенсоров и их сенсорными характеристиками, включающими не только чувствительность и селективность обнаружения вируса гриппа А, но и время жизни сенсора, его способность к работе в реальных биологических жидкостях, а также возможность многократного использования. Полученные данные позволяют обосновать выбор материалов для формирования полупроводникового, рецепторного и биоузнающего слоев, а также методов изготовления ОПТЭЗ-биосенсоров для достижения требуемых сенсорных характеристик с учетом ожидаемых условий применения разрабатываемых биосенсоров и требований к их стоимости, необходимости многоразового использования и т.д.

Разработанные подходы к созданию рецепторных и узнающих слоев для ОПТЭЗ-биосенсоров позволяют обеспечить селективное обнаружение и определение содержания вируса гриппа А в модельных растворах и в реальных биологических жидкостях, таких как назальный мазок, слюна, плазма крови. Чувствительность разработанных ОПТЭЗ-аптасенсоров лежит в диапазоне от 6×10^4 до 6×10^6 вир.частиц/мл, в зависимости от метода формирования рецепторного и биоузнающего слоев, что, как минимум, не хуже чувствительности ИХА тест-полосок на основе антител (10^6 - 10^8 вир.частиц/мл), а в оптимальном случае близко к чувствительности петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией - RT LAMP (10^4 вир.частиц/мл) при несопоставимо более простом, дешевом и быстром подходе к пробоподготовке и измерению сенсорного отклика, занимающем не более 15 минут.

Рассмотрим последовательно каждый из функциональных слоев ОПТЭЗ-биосенсора. Полупроводниковый слой обеспечивает транспорт заряда и соответствующий сенсорный отклик на изменение распределения зарядов в двойных электрических слоях при взаимодействии с частицей-аналитом, а также отвечает за время жизни сенсора и стабильность его работы в жидких средах. В отличие от газовых сенсоров на основе ОПТ использование монослойного полупроводникового слоя, содержащего биотиновые фрагменты, не приводит к сверхвысокой чувствительности ОПТЭЗ-биосенсора из-за потери им работоспособности в процессе иммобилизации узнающего слоя. В то же время использование тонкого полупроводникового слоя с дополнительно нанесенным поверх него рецепторным слоем

обеспечивает максимальную чувствительность сенсора при сохранении его работоспособности.

Упрощение технологии формирования рецепторного слоя за счет использования клик-реакции снижает чувствительность ОПТЭЗ-биосенсора на порядок, однако достигнутые значения чувствительности все еще лежат в диапазоне вирусной нагрузки, типичной для реальных биологических жидкостей (10^5 - 10^8 вирусных частиц гриппа А на мл в назальном мазке), что позволяет при необходимости изготовить более дешевые ОПТЭЗ-биосенсоры.

Предложенные методы биофункционализации поверхности ОПТЭЗ открывают возможность изготовления в том числе многоцветных сенсорных устройств путем использования полимерных трековых мембран, модифицированных соответствующим аптамером, в качестве одноразового, легко заменяемого биоузнающего слоя. Для достижения высокой чувствительности сенсора и линейного отклика в широком диапазоне концентраций целевого вируса необходимо использовать полимерные мембраны с размером пор немного меньшим размера целевого вируса, чтобы в приложенном электрическом поле вирусные частицы могли зайти в поры мембраны и удерживаться в них.

В качестве материалов для формирования биоузнающего слоя ОПТЭЗ отлично подходят ДНК-аптамеры благодаря совокупности своих физико-химических свойств, совмещенных с высокой стабильностью в биологических средах и относительной простотой синтеза, а также возможностью создания структур, высокоаффинных к широкому кругу аналитов. Среди множества аптамеров возможно подобрать структуры для построения модели мультицелевого узнавания одним узнающим элементом, чувствительным к нескольким аналитам одновременно за счет своей способности изменять конформацию под влиянием внешних факторов, например, изменения pH.

Дальнейшее развитие данной работы может быть связано с расширением круга целевых аналитов, например, с проверкой возможности детектирования низкомолекулярных токсинов разработанными ОПТЭЗ-биосенсорами, а также с проверкой возможности реализации многоцелевого детектирования на одной подложке за счет создания на ней выделенных областей с иммобилизацией на эти области различных узнающих элементов. Перспективным может быть и подход, связанный с заменой аптамеров на еще более стабильные узнающие элементы, например, молекулярно импринтированные полимеры. Что касается дальнейшего применения разработанных ОПТЭЗ-биосенсоров, то важной вехой практической реализации должна стать разработка специальной проточной микроячейки, позволяющей работать с очень маленькими объемами анализируемой жидкости без потери чувствительности, а также проверка работоспособности ОПТЭЗ-биосенсоров в плазме крови и других биологических жидкостях.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы к созданию рецепторных и узнающих слоев для жидкостных биосенсоров на основе органических полевых транзисторов с электролитическим затвором, обеспечивающие высокочувствительное селективное обнаружение и определение содержания вируса гриппа А в растворах, в т.ч. в реальных биологических жидкостях, таких как плазма крови, слюна, назальный мазок. Предложенные методы биофункционализации поверхности ОПТЭЗ открывают возможность изготовления многоразовых устройств, а также устройств для мультицелевого детектирования.

2. Впервые исследовано влияние толщины полупроводникового материала на сенсорные характеристики ОПТЭЗ-устройств. Установлено, что тонкий полупроводниковый слой в составе ОПТЭЗ-сенсора с нанесенным поверх него биорецепторным слоем демонстрирует наиболее интенсивный сенсорный отклик на вирус гриппа А, что обеспечивает на порядок большую чувствительность (в 1,5 раза выше) по сравнению с толстым полупроводниковым слоем.

3. Разработан подход к созданию биорецепторных слоев ОПТЭЗ с использованием методов клик-химии на примере азид-алкинового взаимодействия. Определено влияние содержания алкиновой компоненты в составе органического полупроводника на морфологию и функциональность полученного биорецепторного слоя. Показано, что оптимальным является содержание алкин-содержащей компоненты, равное 10 мас.%. Изготовлен биосенсор, обнаруживающий вирус гриппа А в концентрации 3×10^6 вир.частиц/мл.

4. Разработан универсальный подход к изготовлению многоразовых аптасенсоров на основе ОПТЭЗ с полимерными трековыми мембранами в качестве одноразовых, легко заменяемых биоузнающих слоев. Определен наиболее подходящий размер пор мембраны, равный 60 нм, достаточный для проникновения вирусных частиц и их захвата вблизи токопроводящего слоя. Продемонстрирован предел обнаружения изготовленного аптасенсора 8×10^4 вир.частиц/мл.

5. Разработан и успешно реализован подход к изготовлению ОПТЭЗ-аптасенсора, способного к мультицелевому детектированию за счет свойств аптамера, имеющего структуру i-мотив и чувствительного к нескольким анализитам одновременно за счет своей способности изменять конформацию под влиянием внешних факторов, а именно изменения pH. Установлено, что аптамер i-мотив обеспечивает чувствительность ОПТЭЗ к изменению pH среды в биологически значимом диапазоне от 6 до 8, а также чувствительность биосенсора к вирусу гриппа А (при pH 6.0) и к ионам Ag^+ (при pH 7.3).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВАХ – вольтамперная характеристика
- ГКР – спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИХА – иммунохроматографический анализ
- КУС – контактный угол смачивания
- ЛШ – метод Ленгмюра–Шеффера
- МДЛ – метод дозирующего лезвия
- МИП – молекулярно импринтированный полимер
- ОПТ – органический полевой транзистор
- ОПТЭЗ – органический транзистор с электролитным затвором
- ОЭТ – органический электролитический транзистор
- ОЭХТ – органический электрохимический транзистор
- ПДМС – полидиметилсилоксан
- ПОМ – поляризационная оптическая микроскопия
- ПС – полистирол
- ПЭТФ – полиэтилентерефталат
- САМ – самоорганизующийся монослой
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- УНТ – углеродные нанотрубки
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- CuAAC (copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition) – катализируемое Cu(I) азид-алкиновое циклоприсоединение
- ITO (indium tin oxide) – оксид индия-олова

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит О.В. Борщева, М.С. Полинскую, М.С. Скоротецкого и Е.А. Сорокину (ИСПМ РАН) за предоставленные для исследования производные ВТВТ, Е.Ю. Пойманову и П.А. Шапошник (ИСПМ РАН) за консультации и помощь в обсуждении результатов работы, А.А. Абрамова (ИСПМ РАН) за конструирование и изготовление жидкостных измерительных ячеек, Е.Г. Завьялову и А.К. Кешек (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление ДНК-аптамеров и исследуемых в работе аналитов, Е.В. Андреева и А.Н. Нечаева (ОИЯИ, г. Дубна) за предоставление трековых мембран, Д.В. Басманова, К.А. Прусакова, А.С. Гамбаряна (ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России) за изготовление фотошаблонов и электродов методом литографии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou W. и др. Advances in nanowire bioelectronics. – DOI 10.1088/0034-4885/80/1/016701. // Reports on Progress in Physics. – 2017. – Т. 80. – № 1. – С. 016701.
2. Rivnay J. и др. Organic electrochemical transistors. – DOI 10.1038/natrevmats.2017.86. // Nature Reviews Materials. – 2018. – Т. 3. – С. 17086.
3. Wang N. и др. Functionalized Organic Thin Film Transistors for Biosensing. – DOI 10.1021/acs.accounts.8b00448. // Accounts of Chemical Research. – 2019. – Т. 52. – № 2. – С. 277-287.
4. Chang J.F. и др. Enhanced Mobility of Poly(3-hexylthiophene) Transistors by Spin-Coating from High-Boiling-Point Solvents. – DOI 10.1021/cm049617w. // Chemistry of Materials. – 2004. – Т. 16. – № 23. – С. 4772-4776.
5. Шапошник П.А. и др. Современные био-, хемосенсорные и нейроморфные устройства на основе органических полупроводников. – DOI 0.1070/RCR4973?locatt=label:RUSSIAN. // Успехи химии. – 2020. – Т. 89. – № 12. – С. 1483-1506.
6. Xia Y. In Organic Electronics II: More Materials and Applications. – Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012. – P.198. – DOI 10.1002/9783527640218.
7. Шапошник П. и др. Современные био-, хемосенсорные и нейроморфные устройства на основе органических полупроводников. – DOI 10.1070/RCR4973. // Успехи химии. – 2020. – Т. 89. – № 12. – С. 1483-1506.
8. Torsi L. и др. Organic field-effect transistor sensors: a tutorial review. – DOI 10.1039/c3cs60127g. // Chem. Soc. Rev. – 2013 – Т. 42. – № 22. – С. 8612-8628.
9. Colucci R. и др. Recent advances in modeling organic electrochemical transistors. – DOI 10.1088/2058-8585/ab601b. // Flexible and Printed Electronics. – 2020. – Т. 5. – С. 013001.

10. Duan Y. и др. Low-power-consumption organic field-effect transistors. – DOI 10.1088/2515-7639/ab6305. // Journal of Physics: Materials. – 2020 – Т. 3. – № 1. – С. 014009.
11. Zschieschang U. и др. Organic transistors on paper: a brief review Open Access. – DOI 10.1039/c9tc00793h. // Journal of Materials Chemistry C. – 2019. – Т. 7. – № 19. – С. 5522-5533.
12. Someya T. и др. The rise of plastic bioelectronics. – DOI 10.1038/nature21004. // Nature. – 2016. – Т. 540. – С. 379-385.
13. Simon D.T. и др. Organic Bioelectronics: Bridging the Signaling Gap between Biology and Technology. – DOI 10.1021/acs.chemrev.6b00146. // Chemical Reviews. – 2016. – Т. 116. – № 21. – С. 13009- 13041.
14. Sessolo M. и др. Ion-selective organic electrochemical transistors. – DOI 10.1002/adma.201400731. // Advanced Materials. – 2014. – Т. 26. – № 28. – С. 4803-4807.
15. Keene S.T. и др. A biohybrid synapse with neurotransmitter-mediated plasticity. – DOI 10.1038/s41563-020-0703-y. // Nature Materials. – 2020. – Т. 19. – С. 969–973.
16. Kyndiah A. и др. Bioelectronic Recordings of Cardiomyocytes with Accumulation Mode Electrolyte Gated Organic Field Effect Transistors. – DOI 10.1016/j.bios.2019.111844. // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – Т. 150. – С. 111844.
17. Palazzo G. и др. Detection beyond the Debye's length with an electrolyte gated organic field-effect transistor. – DOI 10.1002/adma.201403541. // Adv. Mater. – 2015. – Т. 27. – С. 911.
18. Wu D. и др. Dual-Aptamer Modified Graphene Field-Effect Transistor Nanosensor for Label-Free and Specific Detection of Hepatocellular Carcinoma-Derived Microvesicles. – DOI 10.1021/acs.analchem.9b05531. // Analytical Chemistry. – 2020. – Т. 92. – № 5. – С. 4006-4015.
19. Senshadri P. и др. Low-picomolar, label-free procalcitonin analytical detection with an electrolyte-gated organic field-effect transistor based electronic

immunosensor. – DOI 10.1016/j.bios.2017.12.041. // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 104. – С. 113-119.

20. Hwang M.T. и др. Ultrasensitive detection of nucleic acids using deformed graphene channel field effect biosensors. – DOI 10.1038/s41467-020-15330-9. // Nature Communications. – 2020. – Т. 11. – С. 1543.

21. Macchia E. и др. Ultra-low HIV-1 p24 detection limits with a bioelectronic sensor. – DOI 10.1007/s00216-019-02319-7. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2020. – Т. 412. – С. 811-818.

22. Fenoy G.E. и др. Acetylcholine biosensor based on the electrochemical functionalization of graphene field-effect transistors. – DOI 10.1016/j.bios.2019.111796. // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – Т. 148. – С. 111796.

23. Ohayon D. и др. Biofuel powered glucose detection in bodily fluids with an n-type conjugated polymer. – DOI 10.1038/s41563-019-0556-4. // Nature Materials. – 2020. – Т. 19. – С. 456-463.

24. Ferro M.P. и др. Effect of E Cigarette Emissions on Tracheal Cells Monitored at the Air–Liquid Interface Using an Organic Electrochemical Transistor. – DOI 10.1002/adbi.201800249. // Advanced Biosystems. – 2018. – Т. 3. – № 3. – С. 1800249.

25. Demuru S. и др. Real-Time Multi-Ion Detection in the Sweat Concentration Range Enabled by Flexible, Printed, and Microfluidics-Integrated Organic Transistor Arrays. – DOI 10.1002/admt.202000328. // Advanced Materials Technologies. – 2020. – Т. 5. – № 10. – С. 2000328.

26. Han S. и др. Microfabricated Ion-Selective Transistors with Fast and Super-Nernstian Response. – DOI 10.1002/adma.202004790. // Advanced Materials. – 2020. – Т. 32. № 48. – С. 2004790.

27. Cea C. и др. Enhancement-mode ion-based transistor as a comprehensive interface and real-time processing unit for in vivo electrophysiology. – DOI 10.1038/s41563-020-0638-3. // Nature Materials. – 2020. – Т. 19. – С. 679-686.

28. White S.P. и др. Operating and Sensing Mechanism of Electrolyte-Gated Transistors with Floating Gates: Building a Platform for Amplified Biodetection. – DOI 10.1021/acs.jpcc.5b10694. // The Journal of Physical Chemistry C. – 2016. – Т. 120. – № 1. – С. 108-117.
29. Torricelli F. и др. Electrolyte-gated transistors for enhanced performance bioelectronics. – DOI 10.1038/s43586-021-00065-8. // Nature Reviews Methods Primers. – 2021. – Т. 1. – С. 66.
30. Кулешов Б.С. и др. Мультисенсоры на основе органических полевых транзисторов с электролитическим затвором с аптамерами в качестве узнающих элементов: современное состояние исследований. – DOI 10.59761/RCR5116. // Успехи химии. – 2024. – Т. 93. – № 4. – С. RCR5116.
31. Magliulo M. и др. Label-free C-reactive protein electronic detection with an electrolyte-gated organic field-effect transistor-based immunosensor. – DOI 10.1007/s00216-016-9502-3. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2016. – Т. 408. – С. 3943-3952.
32. Mulla M. и др. Capacitance-modulated transistor detects odorant binding protein chiral interactions. – DOI 10.1038/ncomms7010. // Nature Communications. – 2015. – Т. 6. – С. 6010.
33. Selvaraj M. и др. Label free detection of miRNA-21 with electrolyte gated organic field effect transistors (EGOFETs). – DOI 10.1016/j.bios.2021.113144. // Biosensors and Bioelectronics. – 2021. – Т. 182. – С. 113144.
34. Poimanova E.Yu. и др. Biorecognition Layer Based On Biotin-Containing [1]Benzothieno[3,2-b][1]benzothiophene Derivative for Biosensing by Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistors. – DOI 10.1021/acsami.1c24109. // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2022. – Т. 14. – № 14. – С. 16462-16476.
35. Титова Я.О. и др. Функционализация активного слоя органических электрохимических транзисторов на основе комплекса поли(3,4-этилендиокситиофена) с полистиролсульфокислотой для создания биосенсоров. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2025. – Т. 74. – № 11. – С. 3579-3588.

36. Macchia E. и др. Ultra-sensitive protein detection with organic electrochemical transistors printed on plastic substrates. – DOI 10.1088/2058-8585/aad0cb. // Flexible and Printed Electronics. – 2018. – Т. 3. – С. 034002.
37. Macchia E. и др. Label-Free and Selective Single-Molecule Bioelectronic Sensing with a Millimeter-Wide Self-Assembled Monolayer of Anti-Immunoglobulins. – DOI 10.1021/acs.chemmater.8b04414. // Chemistry of Materials. – 2019. – Т. 31. – № 17. – С. 6476-6483.
38. Macchia E. и др. Selective single-molecule analytical detection of C-reactive protein in saliva with an organic transistor. – DOI 10.1007/s00216-019-01778-2. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2019. – Т. 411. – С. 4899-4908.
39. Шапошник П.А. и др. Простой подход к созданию высокоэффективных органических электролитических транзисторов путем микросегрегации фаз в смесях 2,7 – диоктил[1]бензотено[3,2-b]бензотиофена и полистирола // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. Физическая химия. – 2021. – Т. 496. – № 1. – С. 71-76.
40. Park S.J. и др. Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)-Type Bioelectronic Nose. – DOI 10.1021/nl301714x. // Nano Letters. – 2012. – Т. 12. – № 10. – С. 5082-5090.
41. Liang Y. и др. Wafer-Scale Uniform Carbon Nanotube Transistors for Ultrasensitive and Label-Free Detection of Disease Biomarkers. – DOI 10.1021/acsnano.0c03523. // ACS Nano. – 2020. – Т. 14. – № 7. – С. 8866-8874.
42. Macchia E. и др. Organic Field-Effect Transistor Platform for Label-Free, Single-Molecule Detection of Genomic Biomarkers. – DOI 10.1021/acssensors.0c00694. // ACS Sensors. – 2020. – Т. 5. – № 6. – С. 1822-1830.
43. Sun C. и др. Facile and cost-effective liver cancer diagnosis by water-gated organic field-effect transistors. – DOI 10.1016/j.bios.2020.112251. // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – Т. 164. – С. 112251.
44. Kim D.-J. и др. Electrical Graphene Aptasensor for Ultra-Sensitive Detection of Anthrax Toxin with Amplified Signal Transduction. – DOI 10.1002/sml.201203245. // Small. – 2013. – Т. 9. – № 19. – С. 3352-3360.

45. Casalini S. и др. Organic field-effect transistor for label-free dopamine sensing. – DOI 10.1016/j.orgel.2012.10.027. // Organic Electronics. – 2013. – Т. 14. – № 1. – С. 156-163.
46. Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. – DOI 10.1016/j.brainresrev.2007.05.004. // Brain Research Reviews. – 2007. – Т. 56. – № 1. – С. 27-28.
47. Wickens J.R. и др. Dopaminergic Mechanisms in Actions and Habits. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.1671-07.2007. // Society for Neuroscience. – 2007. – Т. 27. – № 31. – С. 8181-8183.
48. Shervedani R.K. и др. Electrochemical Characterization of In Situ Functionalized Gold Cysteamine Self-Assembled Monolayer with 4-Formylphenylboronic Acid for Detection of Dopamine. – DOI 10.1002/elan.200704096. // Electroanalysis. – 2008. – Т. 20. – № 5. – С. 550-557.
49. Tang H. и др. Highly sensitive dopamine biosensors based on organic electrochemical transistors. – DOI 10.1016/j.bios.2011.05.025. // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – Т. 26. – № 11. – С. 4559-4563.
50. Hoizer B. и др. Characterization of Covalently Bound Anti-Human Immunoglobulins on Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes. – DOI 10.1002/adbi.201700055. // Advanced Biosystems. – 2017. – Т. 1. – № 11. – С. 1700055.
51. Cassalini S. и др. Multiscale Sensing of Antibody–Antigen Interactions by Organic Transistors and Single-Molecule Force Spectroscopy. – DOI 10.1021/acsnano.5b00136. // ACS Nano. – 2015. – Т. 9. – № 5. – С. 5051-5062.
52. Macchia E. и др. New trends in single-molecule bioanalytical detection. – DOI 10.1007/s00216-020-02540-9. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2020. – Т. 412. – С. 5005-5014.
53. Macchia E. и др. Single-molecule detection with a millimetre-sized transistor. – DOI 10.1038/s41467-018-05235-z. // Nature Communications. – 2018. – Т. 9. – С. 3223.

54. Franco C.D. и др. Extended Work Function Shift of Large-Area Biofunctionalized Surfaces Triggered by a Few Single-Molecule Affinity Binding Events. – DOI 10.1002/admi.202201829. // Advanced Materials Interfaces. – 2022. – Т. 10. – № 6. – С. 2201829.
55. Tricase A. и др. Electrochemical Investigation of Self-Assembling Monolayers toward Ultrasensitive Sensing. – DOI 10.1109/FLEPS53764.2022.9781585. // IEEE International Conference on Flexible and Printable Sensors and Systems. – 2022.
56. Macchia E. и др. A handheld intelligent single-molecule binary bioelectronic system for fast and reliable immunometric point-of-care testing. – DOI 10.1126/sciadv.abo0881. // Science advances. – 2022. – Т. 8. – № 27.
57. Macchia E. и др. Large-Area Interfaces for Single-Molecule Label-free Bioelectronic Detection. – DOI 10.1021/acs.chemrev.1c00290. // Chemical reviews. – 2022. – Т. 122. – № 4. – С. 4636-4699.
58. Sun C. и др. Single Molecule Level and Label-Free Determination of Multibiomarkers with an Organic Field-Effect Transistor Platform in Early Cancer Diagnosis. – DOI 10.1021/acs.analchem.2c00897. // Analytical Chemistry. – 2022. – Т. 94. – № 17. – С. 6615-6620.
59. Genco E. и др. A Single-Molecule Bioelectronic Portable Array for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer Precursors. – DOI 10.1002/adma.202304102. // Advanced Materials. – 2023. – Т. 35. – № 42. – С. 2304102.
60. Saylan Y. и др. Biosensing Applications of Molecularly Imprinted-Polymer-Based Nanomaterials. – DOI 10.3390/pr12010177. // Advanced Nanomaterial-Based Sensing in Biological Systems. – 2024. – Т. 12. – № 1. – С. 177.
61. Yilmaz G.E. и др. Selective Amplification of Plasmonic Sensor Signal for Cortisol Detection Using Gold Nanoparticles. – DOI 10.3390/bios12070482. // SPR Biosensors and Their Applications. – 2022. – Т. 12. – № 7. – С. 482.
62. Cui F. и др. A novel magnetic fluorescent biosensor based on graphene quantum dots for rapid, efficient, and sensitive separation and detection of circulating

tumor cells. – DOI 10.1007/s00216-018-1501-0. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2019. – Т. 411. – С. 985-995.

63. Lei J. и др. Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. – DOI 10.1039/c1cs15274b. // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Т. 41. – № 6. – С. 2122-2134.

64. Karaseva N.A. и др. Synthesis and application of molecularly imprinted polymers for trypsin piezoelectric sensors. – DOI 10.1016/j.snb.2018.10.022. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2019. – Т. 280. – С. 272-279.

65. Li Y. и др. A robust electrochemical sensing platform using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted microsphere and its application on methyl parathion detection. – DOI 10.1016/j.bios.2018.01.057. // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 106. – С. 71-77.

66. Gui W. и др. Ratiometric fluorescent sensor with molecularly imprinted mesoporous microspheres for malachite green detection. – DOI 10.1016/j.snb.2018.03.176. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2018. – Т. 266. – С. 685-691.

67. Wu S. и др. Highly sensitive and selective ion-imprinted polymers based on one-step electrodeposition of chitosan-graphene nanocomposites for the determination of Cr (VI). – DOI 10.1016/j.carbpol.2018.04.077. // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Т. 195. – С. 199-206.

68. Ramanaviciene A. и др. Basic Electrochemistry Meets Nanotechnology: Electrochemical Preparation of Artificial Receptors Based on Nanostructured Conducting Polymer, Polypyrrole. – DOI 10.1021/ed083p1212. // Journal of Chemical Education. – 2006. – Т. 83. – № 8. – С. 1212.

69. Baleviciute I. и др. Evaluation of theophylline imprinted polypyrrole film. – DOI 10.1016/j.synthmet.2015.07.021. // Synthetic Metals. – 2015. – Т. 209 – С. 206-211.

70. Ratautaite V. и др. Evaluation of Histamine Imprinted Polypyrrole Deposited on Boron Doped Nanocrystalline Diamond. – DOI 10.1002/elan.201400294. // Electroanalysis. – 2014. – Т. 26. – № 11. – С. 2458-2464.

71. Plausinaitis D. и др. Evaluation of electrochemical quartz crystal microbalance based sensor modified by uric acid-imprinted polypyrrole. – DOI 10.1016/j.talanta.2020.121414. // Talanta. – 2020. – Т. 220. – С. 121414.
72. Ozcelikay G. и др. Electrochemical MIP Sensor for Butyrylcholinesterase. – DOI 10.3390/polym11121970. // Polymers. – 2019. – Т. 11. – № 12. – С. 1970.
73. Ramanaviciene A. и др. Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins. – DOI 10.1016/j.bios.2004.05.014. // Biosensors and Bioelectronics. – 2004. – Т. 20. – № 6. – С. 1076-1082.
74. Piletsky S. и др. Molecularly Imprinted Polymers for Cell Recognition. – DOI 10.1016/j.tibtech.2019.10.002 External Link. // Trends in Biotechnology. – 2020. – Т. 38. – № 4. – С. 368-387.
75. Raziq A. и др. Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen. – DOI 10.1016/j.bios.2021.113029. // Biosensors and Bioelectronics. – 2021. – Т. 178. – С. 113029.
76. Xiao X. и др. Polymer coating for improved redox-polymer-mediated enzyme electrodes: A mini-review. – DOI 10.1016/j.elecom.2021.106931. // Electrochemistry Communications. – 2021. – Т. 124. – С. 106931.
77. VandeZande G.R. и др. Enzyme Immobilization and Mediation with Osmium Redox Polymers. – DOI 10.1007/978-1-4939-6499-4_13. // Methods in Molecular Biology. – 2016. – Т. 1504. – С. 165-179.
78. Milton R.D. и др. Rational design of quinones for high power density biofuel cells. – DOI 10.1039/c5sc01538c. // Chemical science. – 2015. – Т. 6. – № 8. – С. 2867-4875.
79. Arlyapov V.A. и др. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor. – DOI 10.1016/j.enzmictec.2020.109706. // Enzyme and Microbial Technology. – 2021. – Т. 143. – С. 109706.

80. Попов А. и др. Reduced Graphene Oxide and Polyaniline Nanofibers Nanocomposite for the Development of an Amperometric Glucose Biosensor. – DOI 10.3390/s21030948. // Sensors. – 2021. – Т. 21. – № 3. – С. 948.
81. Zhang X. и др. A Label-Free Fluorescent Aptasensor for Detection of Staphylococcal Enterotoxin A Based on Aptamer-Functionalized Silver Nanoclusters. – DOI 10.3390/polym12010152. // Polymers. – 2020. – Т. 12. – № 1. – С. 152.
82. Celiesiute P. и др. Electrochromic Sensors Based on Conducting Polymers, Metal Oxides, and Coordination Complexes. – DOI 10.1080/10408347.2018.1499009. // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2018. – Т. 49. – № 3. – С. 195-208.
83. Попов А. и др. Comparative study of polyaniline (PANI), poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and PANI-PEDOT films electrochemically deposited on transparent indium thin oxide based electrodes. – DOI 10.1016/j.polymer.2019.03.059. // Polymer. – Т. 172. – С. 133-141.
84. Le T.-H. и др. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. – DOI 10.3390/polym9040150. // Polymers. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 150.
85. Ramanavicius S. и др. Conducting Polymers in the Design of Biosensors and Biofuel Cells. – DOI 10.3390/polym13010049. // Polymers. – 2021. – Т. 13. – № 1. – С. 49.
86. German N. и др. Formation and Electrochemical Evaluation of Polyaniline and Polypyrrole Nanocomposites Based on Glucose Oxidase and Gold Nanostructures. – DOI 10.3390/polym12123026. // Polymers. – 2020. – Т. 12. – № 12. – С. 3026.
87. Ramanavicius A. и др. Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design. – DOI 10.1016/j.snb.2014.02.072. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2014. – Т. 197. – С. 237-243.
88. Aydin E.B. и др. Fabrication of electrochemical immunosensor based on acid-substituted poly(pyrrole) polymer modified disposable ITO electrode for sensitive detection of CCR4 cancer biomarker in human serum. – DOI 10.1016/j.talanta.2020.121487. // Talanta. – 2021. – Т. 222. – С. 121487.

89. Shahrokhian S. и др. Ultrasensitive detection of cancer biomarkers using conducting polymer/electrochemically reduced graphene oxide-based biosensor: Application toward BRCA1 sensing. – DOI 10.1016/j.snb.2018.03.120. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Т. 266. – С. 160-169.
90. Won H.J. и др. Wireless label-free electrochemical detection of cancer cells by MnO₂-Decorated polymer dots. – DOI 10.1016/j.snb.2020.128391. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2020. – Т. 320. – С. 128391.
91. Yazdanparast S. и др. Dual-aptamer based electrochemical sandwich biosensor for MCF-7 human breast cancer cells using silver nanoparticle labels and a poly(glutamic acid)/MWNT nanocomposite. – DOI 10.1007/s00604-018-2918-z. // *Microchimica Acta*. – 2018. – Т. 185. – С. 405.
92. Ye W. и др. Marine Toxins Detection by Biosensors Based on Aptamers. – DOI 10.3390/toxins12010001. // *Marine Toxins Detection*. – 2020. – Т. 12. – № 1. – С. 1.
93. Kubo I. и др. Study on Electrochemical Insulin Sensing Utilizing a DNA Aptamer-Immobilized Gold Electrode. – DOI 10.3390/ma8084710. // *Materials*. – 2015. – Т. 8. – № 8. – С. 4710-4719.
94. Vos L.M. и др. Rapid Molecular Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review of Diagnostic Accuracy and Clinical Impact Studies. – DOI 10.1093/cid/ciz056. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2019. – Т. 69. – № 7. – С. 1243-1253.
95. Herrmann B. и др. Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR: Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and Optical Immunoassay (FLU OIA). – DOI 10.1128/jcm.39.1.134-138.2001. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Т. 39. – № 1. – С. 134-138.
96. Chan K.-H. и др. Analytical Sensitivity of Seven Point-of-Care Influenza Virus Detection Tests and Two Molecular Tests for Detection of Avian Origin H7N9 and Swine Origin H3N2 Variant Influenza A Viruses. – DOI 10.1128/jcm.01222-13. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Т. 51. – № 9. – С. 3160-3161.

97. Food and Drug Administration, HHS. Microbiology Devices; Reclassification of Influenza Virus Antigen Detection Test Systems Intended for Use Directly With Clinical Specimens. Final order. // Fed Regist. – 2017. – Т. 82. – № 8. – С. 3609-3619.
98. Ambartsumyan O. и др. SERS-Based Biosensors for Virus Determination with Oligonucleotides as Recognition Elements. – DOI 10.3390/ijms21093373. // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – № 9. – С. 3373.
99. Kim S.M. и др. Recent Development of Aptasensor for Influenza Virus Detection. – DOI 10.1007/s13206-020-4401-2. // BioChip Journal. – 2020. – Т. 14. – С. 327-339.
100. Hassani S. и др. Novel label-free electrochemical aptasensor for determination of Diazinon using gold nanoparticles-modified screen-printed gold electrode. – DOI 10.1016/j.bios.2018.08.041. // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 120. – С. 122-128.
101. Maghsoudi A.S. и др. An Electrochemical Aptasensor Platform Based on Flower-Like Gold Microstructure-Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Detection of Serpin A12 as a Type 2 Diabetes Biomarker. – DOI 10.2147/IJN.S244315. // International Journal of Nanomedicine. – 2020. – Т. 15. – С. 2219-2230.
102. Majdinasab M. и др. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. – DOI 10.3390/ph15010090. // Pharmaceuticals. – 2022. – Т. 15. – № 1. – С. 90.
103. Kukushkin V.I. и др. Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor. – DOI 10.1371/journal.pone.0216247. // PLoS One. – 2019. – Т. 14. – № 4. – С. e0216247.
104. Bizyaeva A.A. и др. The Functional Role of Loops and Flanking Sequences of G-Quadruplex Aptamer to the Hemagglutinin of Influenza a Virus. – DOI 10.3390/ijms22052409. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – № 5. – С. 2409.

105. Zhdanov G. и др. Nanoisland SERS-Substrates for Specific Detection and Quantification of Influenza A Virus. – DOI 10.3390/bios14010020. // Biosensors. – 2024. – Т. 14. – № 1. – С. 20.
106. Yi J. и др. The research of aptamer biosensor technologies for detection of microorganism. – DOI 10.1007/s00253-020-10940-1. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Т. 104. – С. 9877-9890.
107. Song K.-M. и др. Aptamers and Their Biological Applications. – DOI 10.3390/s120100612. // Sensors. – 2012. – Т. 12. – № 1. – С. 612-631.
108. Zhang N. и др. Structural Biology for the Molecular Insight between Aptamers and Target Proteins. – DOI 10.3390/ijms22084093. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – № 8. – С. 4093.
109. Zhou J. и др. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. – DOI 10.1038/nrd.2016.199. // Nature Reviews Drug Discovery. – 2017. – Т. 16. – С. 181-202.
110. Hu X. и др. Structure-Guided Designing Pre-Organization in Bivalent Aptamers. – DOI 10.1021/jacs.1c12593. // Journal American Chemical Society. – 2022. – Т. 144. – № 10. – С. 4507-4514.
111. Taghdisi S.M. и др. Aptamer Biosensor for Selective and Rapid Determination of Insulin. – DOI 10.1080/00032719.2014.956216. // Analytical Letters. – 2015. – Т. 48. – № 4. – С. 672-681.
112. Daems E. и др. Mapping the gaps in chemical analysis for the characterisation of aptamer-target interactions. – DOI 10.1016/j.trac.2021.116311. // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2021. – Т. 142. – С. 116311.
113. Zong C. и др. The Arsenic-Binding Aptamer Cannot Bind Arsenic: Critical Evaluation of Aptamer Selection and Binding. – DOI 10.1021/acs.analchem.9b02789. // Analytical Chemistry. – 2019. – Т. 91. – № 16. – С. 10887-10893.
114. Li X. и др. Plasmonic nanoplatfrom for point-of-care testing trace HCV core protein. – DOI 10.1016/j.bios.2019.111488. // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – Т. 147. – С. 111488.

115. Weerathunge P. и др. Ultrasensitive Colorimetric Detection of Murine Norovirus Using NanoZyme Aptasensor. – DOI 10.1021/acs.analchem.8b03300. // Analytical Chemistry. – 2019. – Т. 91. – № 5. – С. 3270-3276.
116. Palomino-Vizcaino G. и др. Effect of HPV16 L1 virus-like particles on the aggregation of non-functionalized gold nanoparticles. – DOI 10.1016/j.bios.2017.09.001. // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 100. – С. 176-183.
117. Basso C. R. и др. A new immunoassay of hybrid nanomater conjugated to aptamers for the detection of dengue virus. – DOI 10.1016/j.talanta.2019.01.058. // Talanta. – 2019. – Т. 197. – С. 482-490.
118. Feng C. и др. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review. – DOI 10.1016/j.bios.2014.03.014. // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – Т. 59. – С. 64-74.
119. Suh S.-K. и др. Aptamer-based competitive binding assay for one-step quantitation of hepatitis B surface antigen. – DOI 10.1039/c4an00619d. // Analyst. – 2014. – Т. 139. – № 17. – С. 4310-4314.
120. Homola J. и др. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors. – DOI 10.1007/5346_014. // Surface Plasmon Resonance Based Sensors. – 2006. – Т. 4. – С. 45-67.
121. Lee T. и др. Label-free localized surface plasmon resonance biosensor composed of multi-functional DNA 3 way junction on hollow Au spike-like nanoparticles (HAuSN) for avian influenza virus detection. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2019.06.070. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Т. 182. – С. 110341.
122. Nguyen H.H. и др. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. – DOI 10.3390/s150510481. // Sensors. – 2015. – Т. 15. – № 5. – С. 10481-10510.
123. Xu X. и др. Aptamer based SERS detection of Salmonella typhimurium using DNA-assembled gold nanodimers. – DOI 10.1007/s00604-018-2852-0. // Microchimica Acta. – 2018. – Т. 185. – С. 325.

124. Díaz-Amaya S. и др. Aptamer-based SERS biosensor for whole cell analytical detection of E. coli O157:H7. – DOI 10.1016/j.aca.2019.07.028. // *Analytica Chimica Acta*. – 2019. – Т 1081. – С. 146-156.
125. Negri P. и др. Direct Optical Detection of Viral Nucleoprotein Binding to an Anti-Influenza Aptamer. – DOI 10.1021/ac202427e. // *Anal Chem*. – 2012. – Т. 84. – № 13. – С. 5501-5508.
126. Lee T. и др. Fabrication of electrochemical biosensor consisted of multi-functional DNA structure/porous au nanoparticle for avian influenza virus (H5N1) in chicken serum. – DOI 10.1016/j.msec.2019.02.001. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – С. 511-519.
127. Zou X. и др. Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. – DOI 10.3389/fmicb.2019.01462. // *Front. Microbiol*. – 2019. – Т. 10. – С. 01462.
128. Park J. и др. Applications of Field-Effect Transistor (FET)-Type Biosensors. – DOI 10.5757/ASCT.2014.23.2.61. // *Applied Science and Convergence Technology*. – 2014. – Т. 23. – № 2. – С. 61-71.
129. Wang Z. и др. An Ultraflexible and Stretchable Aptameric Graphene Nanosensor for Biomarker Detection and Monitoring. – DOI 10.1002/adfm.201905202. // *Advanced Functional Materials*. – 2019. – Т. 29. – № 44. – С. 1905202.
130. Kim J. и др. Recent Advances in Aptasensor for Cytokine Detection: A Review. – DOI 10.3390/s21248491. // *Sensors*. – 2021. – Т. 21. – № 24. – С. 8491.
131. Hwang M.T. и др. Ultrasensitive Detection of Dopamine, IL-6 and SARS-CoV-2 Proteins on Crumpled Graphene FET Biosensor. – DOI 10.1002/admt.202100712. // *Advanced Materials Technologies*. – 2021. – Т. 6. – № 11. – С. 2100712.
132. Hao Z. и др. Modulating the Linker Immobilization Density on Aptameric Graphene Field Effect Transistors Using an Electric Field. – DOI 10.1021/acssensors.0c00752. // *ACS Sensors*. – 2020. – Т. 5. – № 8. – С. 2503-2513.

133. Tsvetkov V. и др. Unveiling the unusual i-motif-derived architecture of a DNA aptamer exhibiting high affinity for influenza A virus. – DOI 10.1093/nar/gkae1282. // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – Т. 53. – № 1. – С. gkae1282.
134. Musafia B. и др. Designing Anti-Influenza Aptamers: Novel Quantitative Structure Activity Relationship Approach Gives Insights into Aptamer – Virus Interaction. – DOI 10.1371/journal.pone.0097696. // *PLoS One*. – 2014. – Т. 9. – № 5. – С. e97696.
135. Alieva R. и др. Kinetics of i-motif folding within the duplex context. – DOI 10.1016/j.bpc.2024.107350. // *Biophysical Chemistry*. – 2025. – Т. 316. – С. 107350.
136. Tateishi-Karimata H. и др. Roles of non-canonical structures of nucleic acids in cancer and neurodegenerative diseases. – DOI 10.1093/nar/gkab580. // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Т. 49. – № 14. – С. 7839-7855.
137. Niu K. и др. BmILF and i-motif structure are involved in transcriptional regulation of BmPOUM2 in *Bombyx mori*. – DOI 10.1093/nar/gkx1207. // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Т. 46. – № 4. – С. 1710-1723.
138. Xin B.-G. и др. Structural insights into the N-terminal APHB domain of HrpA: mediating canonical and i-motif recognition. – DOI 10.1093/nar/gkae138. // *Nucleic Acids Research*. – 2024. – Т. 52. – № 6. – С. 3406-3418.
139. Miao D. и др. Facile Construction of i-Motif DNA-Conjugated Gold Nanostars as Near-Infrared and pH Dual-Responsive Tar. – DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01159. // *Molecular Pharmaceutics*. – 2020. – Т. 17. – № 4. – С. 1127-1138.
140. Kim J.Y. и др. I-motif-coated exosomes as a pH-sensitive carrier for anticancer drugs. – DOI 10.1007/s13765-018-0394-0. // *Applied Biological Chemistry*. – 2018. – Т. 61. – С. 599-606.
141. Hu Y. и др. Acid-Resistant and Physiological pH-Responsive DNA Hydrogel Composed of A-Motif and i-Motif toward Oral Insulin Delivery. – DOI

10.1021/jacs.1c13426. // Journal American Chemical Society. – 2022. – Т. 144. – № 12. – С. 5461-5470.

142. Li L. и др. Modulating Aptamer Specificity with pH-Responsive DNA Bonds. – DOI 10.1021/jacs.8b08047. // J Am Chem Soc. – 2018. – Т. 140. – № 41. – С. 13335-13339.

143. Lei Y. и др. Ultra-pH-responsive split i-motif based aptamer anchoring strategy for specific activatable imaging of acidic tumor microenvironment. – DOI 10.1039/c8cc04420a. // Chem. Commun. – 2018. – Т. 54. – № 73. – С. 10288-10291.

144. Shi L. и др. Programmable i-motif DNA folding topology for a pH-switched reversible molecular sensing device. – DOI 10.1093/nar/gkx202. // Nucleic Acids Research. – 2017. – Т. 45. – № 8. – С. 4306-4314.

145. Gao J. и др. A highly sensitive electrochemical biosensor via short-stranded DNA activating LAMP(H⁺) to regulate i-motif folds for signal transduction. – DOI 10.1016/j.snb.2023.133354. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2023. – Т. 380. – С. 133354.

146. Shi L. и др. I-motif Formed at Physiological pH Triggered by Spatial Confinement of Nanochannels: An Electrochemical Platform for pH Monitoring in Brain Microdialysates. – DOI 10.1021/acs.analchem.9b05732. // Analytical Chemistry. – 2020. – Т. 92. – № 6. – С. 4535-4540.

147. Rostovtsev V.V. и др. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. – DOI 10.1002/1521-3773(20020715)41:14%3C2596::AID-ANIE2596%3E3.0.CO;2-4. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2002. – Т. 41. – С. 2596-2599.

148. Tornøe C.W. и др. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. – DOI 10.1021/jo011148j. // Journal of Organic Chemistry. – 2002. – Т. 67. – № 9. – С. 3057-3064.

149. Cintas P. и др. Alkyne–azide click reaction catalyzed by metallic copper under ultrasound. – DOI 10.1038/nprot.2010.1. // Nature Protocols. – 2010. – Т. 5. – С. 607-616.

150. **Кретьева Е.А.** и др. Биорецепторный слой, полученный методом «клик»-химии на поверхности органических полевых транзисторов с электролитическим затвором. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2025. – Т. 74. – № 11. – С. 3589-3601.
151. Kuzmin A. и др. Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide–Alkyne Cycloaddition. – DOI 10.1021/bc100306u. // Bioconjugate Chemistry. – 2010. – Т. 21. – № 11. – С. 2076-2085.
152. Gutmann M. и др. Biocompatible Azide–Alkyne “Click” Reactions for Surface Decoration of Glyco-Engineered Cells. – DOI 10.1002/cbic.201500582. // ChemBioChem. – 2016. – Т. 17. – № 9. – С. 866-875.
153. Lang K. и др. Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins. – DOI 10.1021/cb4009292. // ACS Chemical Biology. – 2014. – Т. 9. – № 1. – С. 16-20.
154. Elchinger P.-H. и др. Polysaccharides: The “Click” Chemistry Impact. – DOI 10.3390/polym3041607. // Polymers. – 2011. – Т. 3. – № 4. – С. 1607-1651.
155. Brewer G.J. и др. Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans. – DOI 10.1021/tx900338d. // Chemical Research in Toxicology. – 2010. – Т. 23. – № 2. – С. 319-326.
156. Stadtman E.R. и др. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. – DOI 10.1016/S0021-9258(18)52199-2. // J. Biol. Chem. – 1991. – Т. 266. – № 4. – С. 2005-2008.
157. Hong V. и др. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. – DOI 10.1002/anie.200905087. // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – Т. 48. – № 52. – С. 9879-9883.
158. Liu Y. и др. Model Studies on the Metal-Catalyzed Protein Oxidation: Structure of a Possible His-Lys Cross-Link. – DOI 10.1021/tx034167s. // Chemical Research in Toxicology. – 2004. – Т. 17. – № 1. – С. 110-118.
159. Cao B. и др. Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. – DOI 10.1007/s10544-012-9651-x. // Biomedical Microdevices. – 2012. – Т. 14. – С. 709-720.

160. Hong V. и др. Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Click Chemistry. – DOI 10.1021/bc100272z. // Bioconjugate Chemistry. – 2010. – Т. 21. – № 10. – С. 1912-1916.
161. Kennedy D.C. и др. Cellular Consequences of Copper Complexes Used To Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. – DOI 10.1021/ja2083027. // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Т. 133. – № 44. – С. 17993-18001.
162. Uttamapinant C. и др. Site-specific protein labeling using PRIME and chelation-assisted click chemistry. – DOI 10.1038/nprot.2013.096. // Nature Protocols. – 2013. – Т. 8 – С. 1620-1634.
163. Presolski S.I. и др. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. – DOI 10.1002/9780470559277.ch110148. // Current Protocols in Chemical Biology. – 2011. – Т. 3. – № 4. – С. 153-162.
164. Dollwet H. и др. Historic uses of copper compounds in medicine. // Trace Elem. Med. – 1985. – Т. 2. – С. 80-87.
165. Devaraj N.K. и др. Chemoselective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers. – DOI 10.1021/ja051462l. // Journal of the American Chemical Society. – 2005. – Т. 127. – № 24. – С. 8600-8601.
166. Collman J.P. и др. “Clicking” Functionality onto Electrode Surfaces. – DOI 10.1021/la0362977. // Langmuir. – 2004. – Т. 20. – № 4. – С. 1051-1053.
167. Collman J.P. и др. Mixed Azide-Terminated Monolayers: A Platform for Modifying Electrode Surfaces. – DOI 10.1021/la052947q. // Langmuir. – 2006. – Т. 22. – № 6. – С. 2457-2464.
168. Devaraj N.K. и др. Rate of Interfacial Electron Transfer through the 1,2,3-Triazole Linkage. – DOI 10.1021/jp057416p. // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – Т. 110. – № 32. – С. 15955-15962.
169. Decréau R.A. и др. Syntheses of Hemoprotein Models that can be Covalently Attached onto Electrode Surfaces by Click Chemistry. – DOI 10.1021/jo062349w. // Journal of Organic Chemistry. – 2007. – Т. 72. – № 8. – С. 2794-2802.

170. Prakash S. и др. “Click” Modification of Silica Surfaces and Glass Microfluidic Channels. – DOI 10.1021/ac061824n. // Analytical Chemistry. – 2007. – Т. 79. – № 4. – С. 1661-1667.
171. Sun X.-L. и др. Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces by Sequential Diels–Alder and Azide–Alkyne Cycloadditions. – DOI 10.1021/bc0502311. // Bioconjugate Chemistry. – 2006. – Т. 17. – № 1. – С. 52-57.
172. Belder D. И др. Directed control of electroosmotic flow in nonaqueous electrolytes using poly(ethylene glycol) coated capillaries. – DOI 10.1002/1522-2683(200102)22:4<666::AID-ELPS666>3.0.CO;2-O. // Electrophoresis. – 2001. – Т. 22. – № 4. – С. 666-672.
173. Erim F.B. и др. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis. – DOI 10.1016/0021-9673(95)00394-3. // Journal of Chromatography A. – 1995. – Т. 708. – № 2. – С. 356-361.
174. Lee B.S. и др. Surface-Initiated, Atom Transfer Radical Polymerization of Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate and Subsequent Click Chemistry for Bioconjugation. – DOI 10.1021/bm060782+. // Biomacromolecules. – 2007 – Т. 8. – № 2. – С. 744-749.
175. Fenoy G.E. и др. “Clickable” Organic Electrochemical Transistors. – DOI 10.1021/jacsau.2c00515. // JACS Au. – 2022. – Т. 2. – № 12. – С. 2778-2790.
176. Fenoy G.E. и др. Interface Engineering of “Clickable” Organic Electrochemical Transistors toward Biosensing Devices. – DOI 10.1021/acsami.2c21493. // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2023. – Т. 15. – № 8. – С. 10885-10896.
177. Berto M. и др. EGOFET Peptide Aptasensor for Label-Free Detection of Inflammatory Cytokines in Complex Fluids. – DOI 10.1002/adbi.201700072. // Advanced Biosystems. – 2017. – Т. 2. – № 2. – С. 1700072.
178. Li L. и др. Recent Advances in Immobilization Strategies for Biomolecules in Sensors Using Organic Field-Effect Transistors. – DOI

10.1007/s12209-020-00234-y. // Transactions of Tianjin University. – 2020. – Т. 26. – С. 424-440.

179. Decataldo F. и др. Organic Electrochemical Transistors for Real-Time Monitoring of In Vitro Silver Nanoparticle Toxicity. – DOI 10.1002/adbi.201900204. // Advanced Biosystems. – 2019. – Т. 4. – № 1. – С. 1900204.

180. Zhang Z. и др. Long-term and label-free monitoring for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using force sensor and impedance measurement. – DOI 10.1039/d0tb01968b. // Journal of Materials Chemistry B. – 2020. – Т. 8. – № 23. – С. 9913-9920.

181. Seo G. и др. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. – DOI 10.1021/acsnano.0c02823. // ACS Nano. – 2020. – Т. 14. – № 4. – С. 5135-5142.

182. Romele P. и др. Multiscale real time and high sensitivity ion detection with complementary organic electrochemical transistors amplifier. – DOI 10.1038/s41467-020-17547-0. // Nature Communications. – 2020. – Т. 11. – С. 3743.

183. White S.P. и др. Rapid, Selective, Label-Free Aptameric Capture and Detection of Ricin in Potable Liquids Using a Printed Floating Gate Transistor. – DOI 10.1021/acssensors.6b00481. // ACS Sensors. – 2016. – Т. 1. – № 10. – С. 1213-1216.

184. White S.P. и др. Detection and Sourcing of Gluten in Grain with Multiple Floating-Gate Transistor Biosensors. – DOI 10.1021/acssensors.7b00810. // ACS Sensors. – 2018. – Т. 3. – № 2. – С. 395-402.

185. Lai S. и др. Tailoring the sensing performances of an OFET-based biosensor. – DOI 10.1016/j.snb.2016.04.095. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – Т. 233. – С. 314-319.

186. Apel P.Y. Fabrication of functional micro- and nanoporous materials from polymers modified by swift heavy ions. – DOI 10.1016/j.radphyschem.2019.01.009. // Radiation Physics and Chemistry. – 2019. – Т. 159. – С. 25-34.

187. Korolkov I.V. и др. Preparation of Hydrophobic PET Track-Etched Membranes for Separation of Oil–Water Emulsion. – DOI 10.3390/membranes11080637. // Membranes. – 2021. – Т. 11. – № 8. – С. 637.
188. Shumskaya A. и др. Modified ion-track membranes for separation of biological objects. – DOI 10.1088/2053-1591/ab294c. // Materials Research Express. – 2019. – Т. 6. – № 8. – С. 0850h3.
189. Zinggeler M. и др. Biophysical Insights on the Enrichment of Cancer Cells from Whole Blood by (Affinity) Filtration. – DOI 10.1038/s41598-018-37541-3. // Sci Rep. – 2019. – Т. 9. – С. 1246.
190. Zarubim M. и др. Developing tardigrade-inspired material: Track membranes functionalized with Dsup protein for cell-free DNA isolation. – DOI 10.1002/btpr.3478. // Biotechnology Progress. – 2024. – Т. 40. – № 5. – С. e3478.
191. Peinetti A.S. и др. Direct detection of human adenovirus or SARS-CoV-2 with ability to inform infectivity using DNA aptamer-nanopore sensors. – DOI 10.1126/sciadv.abh2848. // Science advances. – 2021. – Т. 7. – № 39. – С. eabh2848.
192. Li J. и др. Fabrication of reusable electrochemical biosensor and its application for the assay of α -glucosidase activity. – DOI 10.1016/j.aca.2018.04.015. // Analytica Chimica Acta. – 2018. – Т. 1026. – С. 140-146.
193. Cunha I. и др. Reusable Cellulose-Based Hydrogel Sticker Film Applied as Gate Dielectric in Paper Electrolyte-Gated Transistors. – DOI 10.1002/adfm.201606755. // Advanced Functional Materials. – 2017. – Т. 27. – № 16. – С. 1606755.
194. Wustoni S. и др. An organic electrochemical transistor integrated with a molecularly selective isoporous membrane for amyloid- β detection. – DOI 10.1016/j.bios.2019.111561. // Biosensors and Bioelectronics. – 2019. – Т. 143. – С. 111561.
195. Sexton L.T. и др. Resistive-Pulse Studies of Proteins and Protein/Antibody Complexes Using a Conical Nanotube Sensor. – DOI 10.1021/ja0739943. // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Т. 129. – № 43. – С. 13144-13152.

196. Wang C. и др. Atomic Layer Deposition Modified Track-Etched Conical Nanochannels for Protein Sensing. – DOI 10.1021/acs.analchem.5b01501. // Analytical Chemistry. – 2015. – Т. 87. – № 16. – С. 8227-8233.
197. Wang J. и др. Single Nanochannel-Aptamer-Based Biosensor for Ultrasensitive and Selective Cocaine Detection. – DOI 10.1021/acsami.7b16539. // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2018. – Т. 10. – № 2. – С. 2033-2039.
198. Ali M. и др. Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores. – DOI 10.1039/c5cc00257e. // Chem. Commun. – 2015. – Т. 51. – № 16. – С. 3454-3457.
199. Kukushkin V. и др. Aptamer-coated track-etched membranes with a nanostructured silver layer for single virus detection in biological fluids. – DOI 10.3389/fbioe.2022.1076749. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 1076749.
200. Jin N. и др. A microfluidic biosensor based on finger-driven mixing and nuclear track membrane filtration for fast and sensitive detection of Salmonella. – DOI 10.1016/j.bios.2022.114844. // Biosensors and Bioelectronics. – 2023. – Т. 220. – С. 114844.
201. Kaya D. и др. Review—Track-Etched Nanoporous Polymer Membranes as Sensors: A Review. – DOI 10.1149/1945-7111/ab67a7. // Journal of The Electrochemical Society. – 2020. – Т. 167. – № 3. – С. 037543.
202. Ma T. и др. Track-Etched Nanopore/Membrane: From Fundamental to Applications. – DOI 10.1002/smt.202000366. // Small Methods. – 2020. – Т. 4. – № 9. – С. 2000366.
203. Liang C.Z. и др. A review of polymeric composite membranes for gas separation and energy production. – DOI 10.1016/j.progpolymsci.2019.06.001. // Progress in Polymer Science. – 2019. – Т. 97. – С. 101141.
204. Kontogeorgis G.M. и др. The Debye-Hückel theory and its importance in modeling electrolyte solutions. – DOI 10.1016/j.fluid.2018.01.004. // Fluid Phase Equilibria. – 2018. – Т. 462. – С. 130-152.

205. Magliulo M. и др. Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor Sensors Based on Supported Biotinylated Phospholipid Bilayer. – DOI 10.1002/adma.201203587. // *Advanced materials*. – 2012. – Т. 25. – С. 2090-2094.
206. Saito M. и др. One-step synthesis of [1]benzothieno[3,2-b][1]benzothiophene from o-chlorobenzaldehyde. – DOI 10.1016/j.tetlet.2010.11.021. // *Tetrahedron Letters*. – 2011. – Т. 52. – № 2. – С. 285-288.
207. Trul A.A. и др. Operationally Stable Ultrathin Organic Field Effect Transistors Based on Siloxane Dimers of Benzothieno[3,2-b][1]Benzothiophene Suitable for Ethanethiol Detection. – DOI 10.1002/aelm.202101039. // *Advanced Electronic Materials*. – 2022. – Т. 8. – № 5. – С. 2101039.
208. Гудкова И.О. и др. Особенности восстановления кетогруппы в синтезе моно- и диалкилзамещенных производных бензо[*b*]бензо[4,5]тиено[2,3-*d*]тиофена. – DOI 10.31857/S0514749224070021. // *Журнал органической химии*. – 2024. – Т. 60. – № 7. – С. 13-25.
209. Doerflinger A. и др. Biotin-functionalized targeted polydiacetylene micelles. – DOI 10.1039/c8cc00553b. // *Chem. Commun.* – 2018. – Т. 54. – № 29. – С. 3613-3616.
210. Shaposhnik P.A., **Kretova E.A.** и др. Applying of C8-BTBT-Based EGOFETs at Different pH Values of the Electrolyte. – DOI 10.3390/chemosensors11020074. // *Chemosensors*. – 2023. – Т. 11. – № 2. – С. 74.
211. Shaposhnik P.A. и др. A Simple Approach to Fabrication of Highly Efficient Electrolyte-Gated Organic Transistors by Phase Microsegregation of 2,7-Dioctyl [1]benzothieno[3,2-b]benzothiophene and Polystyrene Mixtures. – DOI 10.1134/S0012501621020019. // *Doklady Physical Chemistry*. – 2021. – Т. 496. – С. 20-24.
212. Flerov G.N. и др. Use of heavy-ion accelerators to produce nuclear membranes. – DOI 10.1007/BF01123341. // *Soviet Atomic Energy*. – 1989. – Т. 67. – С. 763-770.
213. Apel P.Yu. Track-Etching. – DOI 10.1002/9781118522318.emst040. // *Encyclopedia of Membrane Science and Technology*. – 2013. – Т. 3. – С. 1-25.

214. Zaumseil J. и др. Electron and Ambipolar Transport in Organic Field-Effect Transistors. – DOI 10.1021/cr0501543. // Chemical Reviews. – 2007. – Т. 107. – № 4. – С. 1296-1323.
215. Wu X. и др. Air Effect on the Ideality of p-Type Organic Field-Effect Transistors: A Double-Edged Sword. – DOI 10.1002/adfm.201906653. // Advanced Functional Materials. – 2019. – Т. 29. – № 51. – С. 1906653.
216. Poimanova E.Y., **Kretova E.A.** и др. Quantitative Detection of the Influenza A Virus by an EGO-FET-Based Portable Device. – DOI 10.3390/chemosensors11080464. // Chemosensors. – 2023. – Т. 11. – № 8. – С. 464.
217. Xie P. и др. Structures, Properties, and Device Applications for [1]Benzothieno[3,2-b]Benzothiophene Derivatives. – DOI 10.1002/adfm.202200843. // Advanced Functional Materials. – 2022. – Т. 32. – № 21. – С. 2200843.
218. Anisimov D.S. и др. Fully integrated ultra-sensitive electronic nose based on organic field-effect transistors. – DOI 10.1038/s41598-021-88569-x. // Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – С. 10683.
219. Bayn A. и др. Field Effect Transistors Based on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for the Detection and Classification of Volatile Organic Compounds. – DOI 10.1021/am4005144. // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2013. – Т. 5. – № 8. – С. 3431-3440.
220. Poimanova E.Y., **Kretova E.A.** и др. A universal approach to the fabrication of reusable EGO-FET-based aptasensors with track-etched membranes for biorecognition layers. – DOI 10.1039/d4tb02536a. // J. Mater. Chem. B. – 2025. – Т. 13. – С. 4681-4692.
221. Zhavnerko G.K. и др. Developing Langmuir–Blodgett strategies towards practical devices. – DOI 10.1016/j.mseb.2009.12.005. // Materials Science and Engineering: B. – 2010. – Т. 169. – № 1-3. – С. 43-48.
222. Novoseltseva A.A. и др. Structural and Functional Aspects of G-Quadruplex Aptamers Which Bind a Broad Range of Influenza A Viruses. – DOI 10.3390/biom10010119. // Biomolecules. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 119.

223. Shiratori I. и др. Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity. – DOI 10.1016/j.bbrc.2013.11.041. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2014. – Т. 443. – № 1. – С. 37-41.
224. Kukushkin V. и др. Multiplex Lithographic SERS Aptasensor for Detection of Several Respiratory Viruses in One Pot. – DOI 10.3390/ijms24098081. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – № 9. – С. 8081.
225. Chung H.-Y. и др. Novel dual multiplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus using the BD MAX open system. – DOI 10.1080/22221751.2021.1873073. // Emerging Microbes & Infections. – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 161-166.
226. Luo S. и др. Reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of H10 subtype avian influenza viruses. – DOI 10.1186/s12985-015-0378-1. // Virology Journal. – 2015. – Т. 12. – С. 145.
227. Tsang T. и др. Influenza A Virus Shedding and Infectivity in Households. – DOI 10.1093/infdis/jiv225. // The Journal of Infectious Diseases. – 2015. – Т. 212. – №9. – С. 1420-1428.
228. Kaur J. и др. An Overview of Recent Advances in Biomedical Applications of Click Chemistry. – DOI 10.1021/acs.bioconjchem.1c00247. // Bioconjugate Chemistry. – 2021. – Т. 32. – № 8. – С. 1455-1471.
229. Fantoni N.Z. и др. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. – DOI 10.1021/acs.chemrev.0c00928. // Chemical Reviews. – 2021. – Т. 121. – № 12. – С. 7122-7154.
230. Moses J.E. и др. The growing applications of click chemistry. – DOI 10.1039/b613014n. // Chem Soc Rev. – 2007. – Т. 36. – № 8. – С. 1249-1262.
231. Zhdanov G. и др. A Combination of Membrane Filtration and Raman-Active DNA Ligand Greatly Enhances Sensitivity of SERS-Based Aptasensors for Influenza A Virus. – DOI 10.3389/fchem.2022.937180. // Frontiers in Chemistry. – 2022. – Т. 10. – С. 937180.

232. Huang Q.J. и др. Quantitative structural analysis of influenza virus by cryo-electron tomography and convolutional neural networks. – DOI 10.1016/j.str.2022.02.014. // Structure. – 2022. – Т. 30. – № 5. – С. 777-786.

233. Mathad R.I. и др. c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III 1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability. – DOI 10.1093/nar/gkr612. // Nucleic Acids Research. – 2011. – Т. 39. – № 20. – С. 9023-9033.

234. Poimanova E.Y., **Kretova E.A.** и др. Single-chip multitarget detection by EGOFET-based aptasensor. – DOI 10.1039/d5tb02347e. // J. Mater. Chem. B. – 2026. – Т. 14. – С. 2543-2555.

235. Sizov A.S. и др. Highly Sensitive Air-Stable Easily Processable Gas Sensors Based on Langmuir–Schaefer Monolayer Organic Field-Effect Transistors for Multiparametric H₂S and NH₃ Real-Time Detection. – DOI 10.1021/acsami.8b15427. // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2018. – Т. 10. – № 50 – С. 43831-43841.