

КНИ-БИОСЕНСОР НОВОЙ ТОПОЛОГИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МАРКЕРА ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА – ТРОПОНИНА I

DOI: 10.17691/stm2024.16.1.04
УДК 616.127–005.8–036.11:621.38
Поступила 22.09.2023 г.

© **А.А. Черемискина**, младший научный сотрудник¹;
В.В. Красицкая, к.б.н., старший научный сотрудник²;
В.М. Генералов, д.т.н., ведущий научный сотрудник¹; профессор факультета автоматики
и компьютерной инженерии³;
Л.А. Франк, д.б.н., главный научный сотрудник²;
А.В. Глухов, к.т.н., зам. генерального директора по научной работе⁴;
М.В. Кручинина, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник⁵;
Г.А. Кудров, младший научный сотрудник¹;
Д.Е. Сердюк, инженер-конструктор 2-й категории⁴;
В.К. Грабежова, генеральный директор⁶

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559;

²Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50, стр. 50, Красноярск, 660036;

³Новосибирский государственный технический университет, проспект К. Маркса, 20, Новосибирск, 630073;

⁴АО «Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток», ул. Дачная, 60, Новосибирск, 630082;

⁵Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины —
филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089;

⁶Дизайн-центр биомикроэлектронных технологий «ВЕГА», ул. Дачная, 60а, Новосибирск, 630082

Перспективным устройством для детекции биологических молекул, в частности таких как тропонин I, является биосенсор на основе полевых транзисторов на структурах кремний-на-изоляторе (КНИ-биосенсор), который позволяет проводить анализ в режиме реального времени без использования меток.

Цель исследования — разработка конструкции КНИ-биосенсора для детекции маркера острого инфаркта миокарда — тропонина I.

Особенность биосенсора состояла в интеграции двух электродов заземления непосредственно на поверхность биосенсора, что эффективно уменьшало статический потенциал жидкого образца, а также сводило к минимуму физические поломки конструктивных элементов устройства.

Материалы и методы. Для специфической детекции маркера в качестве рецепторов использовали высокоспецифичный анти-тропонин I ДНК-аптамер. Имобилизацию аптамера на поверхность биосенсора проводили методом физической адсорбции. Анализируемый диапазон целевого тропонина I составил 10^{-11} – 10^{-9} моль/л, что соответствует клиническому уровню белка в биологической пробе при остром инфаркте миокарда. В течение эксперимента поддерживалось постоянное напряжение — $V_{ds}=0,15$ В.

Результаты. КНИ-биосенсор успешно обнаружил целевые молекулы тропонина I в концентрации 10^{-11} моль/л, время анализа занимало примерно 200–300 с на одну пробу. В процессе детекции выявлено заметное снижение тока биосенсора. Это свидетельствует о том, что образующийся комплекс «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер» обладает отрицательным эффективным электрическим зарядом на границе раздела фаз «жидкая проба–нанопроволока».

Для контактов: Черемискина Анастасия Алексеевна, e-mail: cheremiskina_aa@vector.nsc.ru

Ключевые слова: биосенсор; нанопроволока; кремний-на-изоляторе; полевой транзистор; тропонин I; инфаркт миокарда; аптамер; физическая адсорбция.

Как цитировать: Cheremiskina A.A., Krasitskaya V.V., Generalov V.M., Frank L.A., Glukhov A.V., Kruchinina M.V., Kudrov G.A., Serdyuk D.E., Grabezova V.K. Novel SOI-biosensor topology for the detection of an acute myocardial infarction marker — troponin I. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(1): 37, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.1.04>

English

Novel SOI-Biosensor Topology for the Detection of an Acute Myocardial Infarction Marker — Troponin I

A.A. Cheremiskina, Junior Researcher¹;
V.V. Krasitskaya, PhD, Senior Researcher²;
V.M. Generalov, DSc, Leading Researcher¹; Professor, Faculty of Automation and Computer Engineering³;
L.A. Frank, DSc, Chief Researcher²;
A.V. Glukhov, PhD, Deputy General Director for Research⁴;
M.V. Kruchinina, MD, DSc, Associate Professor, Leading Researcher⁵;
G.A. Kudrov, Junior Researcher¹;
D.E. Serdyuk, Design Engineer of Grade 2⁴;
V.K. Grabezova, General Director⁶

¹Federal Budgetary Research Institution, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia;

²Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, 50/50 Bld., Akademgorodok St., Krasnoyarsk, 660036, Russia;

³Novosibirsk State Technical University, 20 Prospekt K. Marksa, Novosibirsk, 630073, Russia;

⁴Joint Stock Company “Novosibirsk Factory of Semiconductor Devices VOSTOK”, 60 Dachnaya St., Novosibirsk, 630082, Russia;

⁵Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 175/1 B. Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia;

⁶Joint Stock Company “Design Center for Biomicroelectronic Technologies Vega”, 60a Dachnaya St., Novosibirsk, 630082, Russia

A biosensor based on field-effect transistors on silicon-on-insulator structures (SOI-biosensor) is a high-potential device for detection of biological molecules, for instance, such as troponin I; the biosensor allows conducting label-free real-time analysis.

The aim of the study is the development of SOI-biosensor design for detection of acute myocardial infarction marker — troponin I.

A notable feature of this design was the integration of two grounding electrodes directly onto the biosensor surface, which effectively nullified the static potential of the liquid sample and minimized physical breakdowns of biosensor elements.

Materials and Methods. The highly specific anti-troponin I DNA aptamer was used as a receptor for specific detection of protein marker. Aptamer immobilization on the biosensor surface was carried out by physical adsorption. The analyzed range of target troponin I molecules concentration in the sample varied within 10^{-11} to 10^{-9} mol/L, mirroring clinical levels observed in myocardial infarction cases. During the experiment, a constant voltage of $V_{ds}=0.15$ V was maintained.

Results. The developed SOI-biosensor successfully detected target troponin I molecules at a concentration of 10^{-11} mol/L. The detection process exhibited an effective time of approximately 200–300 s per sample. Moreover, analysis of the detection process revealed a noticeable decrease in current within the source-drain circuit, indicative of the negatively charged complex formed by troponin I and anti-troponin I DNA-aptamer at the “liquid sample–nanowire” phase interface.

Key words: biosensor; nanowire; silicon-on-insulator; field-effect transistor; troponin I; myocardial infarction; aptamer; physical adsorption.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает ведущее место среди основных причин смертности [1]. Нарушение кровоснабжения сердечной мышцы может

привести к развитию инфаркта миокарда (ИМ), вызванного атеросклеротическим поражением артерий и последующими некротическими процессами в сердечной ткани [2]. Степень поражения сердечной мышцы напрямую коррелирует со временем, прошедшим с момента начала заболевания и восстановления про-

ходимости пораженных сосудов, поэтому своевременная и точная диагностика играет решающую роль в оказании оперативной помощи пациенту.

Одним из диагностических подходов для выявления заболевания является обнаружение молекулярных маркеров, связанных с ИМ. Главным маркером, измеряемым в крови пациентов, считается тропонин I (сTnI) [3]. Этот белок обладает высокой клинической чувствительностью к ИМ и демонстрирует практически исключительную специфичность к ткани миокарда [4–8]. Повышенные уровни сTnI в кровотоке указывают на гибель сократительных клеток миокарда [6]. Обычно нормальные концентрации сTnI в сыворотке составляют менее 0,6 нг/мл (приблизительно $2,5 \times 10^{-11}$ М) [9, 10]. Незначительное повреждение миокарда можно наблюдать при концентрациях сTnI в диапазоне от 0,7 до 1,4 нг/мл, тогда как некротическое повреждение миокарда проявляется при концентрациях белка, превышающих 1,5 нг/мл [9].

Современным и перспективным методом детекции тропонина I является биосенсор на основе полевых транзисторов на структурах кремний-на-изоляторе (КНИ-биосенсор) [11–14], который позволяет проводить анализ в режиме реального времени без использования меток. Кроме того, на его основе можно создать портативный инструмент для мультикомплексного анализа различных биологических частиц (белков, вирусных частиц, нуклеиновых кислот и т.д.) [8, 11, 12, 15, 16].

КНИ-биосенсор включает в себя два основных компонента: рецепторный слой (содержит антитела, аптамеры, ферменты и т.д.) и транзьюсер — полевой транзистор, состоящий из кремниевой нанопроволоки, расположенной между электродами истока и стока [9]. Слой рецептора обеспечивает биоспецифическое распознавание целевой молекулы: взаимодействие между рецептором и целевой молекулой генерирует химический или физический сигнал. Затем этот сигнал преобразуется в электрический выходной сигнал транзьюсером [8, 11, 15, 17–19]. Широкое применение получили КНИ-биосенсоры, в которых электрод заземления вводится непосредственно в анализируемую жидкую пробу по принципу «сверху» для устранения случайного электрического потенциала, вызванного ионами и заряженными молекулами [15, 17, 18, 20–22].

На рис. 1 показаны вариант конструкции и электрическая принципиальная схема подключения КНИ-биосенсора [11, 13, 15, 18, 20, 23, 24].

Относительно недавно в качестве рецепторов было предложено использовать аптамеры [25–30]. Они представляют собой короткие синтетические одноцепочечные дезокси- или рибоолигонуклеотиды, которые имеют уникальную форму и могут избирательно связываться с соответствующей целевой молекулой

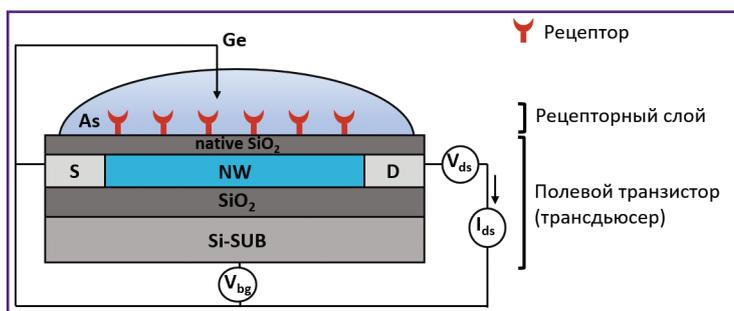


Рис. 1. Вариант конструкции и электрическая принципиальная схема подключения КНИ-биосенсора [11, 13, 15, 18, 20, 23, 24]:

S — исток; NW — кремниевая нанопроволока; D — сток; SiO₂ — скрытый диэлектрик; As — анализируемый раствор, содержащий целевые молекулы; Si-SUB — кремниевая подложка, или тыльный затвор; V_{ds} — источник постоянного напряжения в цепи исток–сток; V_{bg} — регулируемый источник напряжения на подзатворе; I_{ds} — амперметр; Ge — электрод заземления; native SiO₂ — слой естественного оксида кремния

[29–31]. Подобно антителам, аптамеры проявляют высокую аффинность связывания.

Использование КНИ-биосенсора для детекции сTnI и других биологических молекул осложнено рядом проблем, включая топологию и конструкцию биосенсора, оптимальные условия подготовки поверхности и вероятность того, что целевые молекулы адсорбируются на поверхность биосенсора [13, 15, 16, 20, 24, 32].

Цель исследования — разработка конструкции КНИ-биосенсора для детекции маркера острого инфаркта миокарда — тропонина I.

Материалы и методы

Структура КНИ-биосенсора. Разработана конструкция КНИ-биосенсора с двумя интегрированными электродами заземления на поверхности кристалла микросхемы. Топология кристалла и конструкция КНИ-биосенсора представлены на рис. 2 и 3 соответственно. Нестандартное изделие изготавливали на АО «Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток».

Массив из десяти КНИ-биосенсоров с n-типом проводимости сформирован на кремниевом кристалле размером 6×6 мм (рис. 2, а). Толщина слоя кремния (Si-SUB) составила 28–30 нм, слоя скрытого диэлектрика (SiO₂) — 200 нм. Тыльная сторона кристалла приклеена к корпусу микросхемы, контакты осуществлены с помощью алюминиевых проводов. Нанопроволока (NW) биосенсора обладала следующими геометрическими характеристиками: высота (H) — от 20 до 30 нм, ширина (W) — 3 мкм и длина (L) — 10 мкм.

КНИ-биосенсоры подключены одним выходом к электроду заземления (3) и истоку (1). Второй выход подключен к контактным площадкам, выполняющим функцию стока, — 4 (см. рис. 2, а).

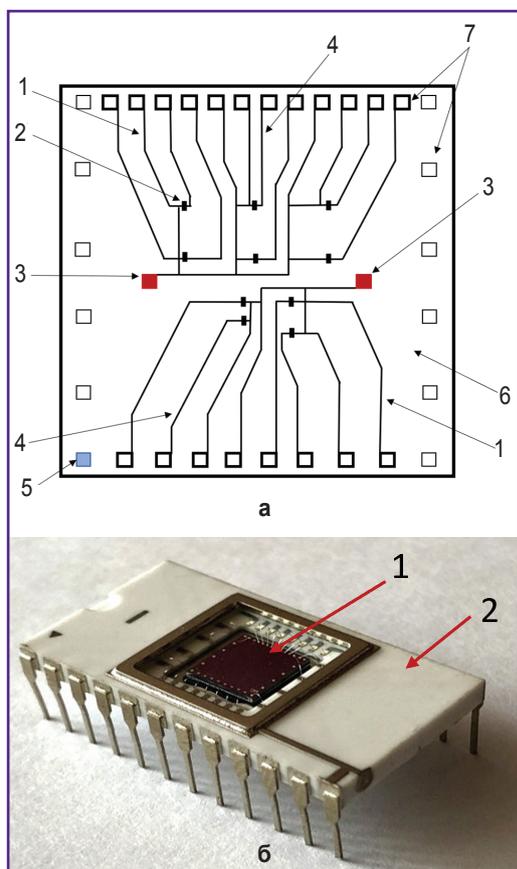


Рис. 2. Разработанное устройство:
 а — топология кристалла на структуре кремний-на-изоляторе: 1 — исток; 2 — КНИ-биосенсор; 3 — электрод заземления; 4 — сток; 5 — управляющий электрод (контактная площадка затвора); 6 — кристалл; 7 — типовые контактные площадки; б — фотография микросхемы, состоящая из кремниевого кристалла с массивом из десяти КНИ-биосенсоров (1) и корпуса (2)

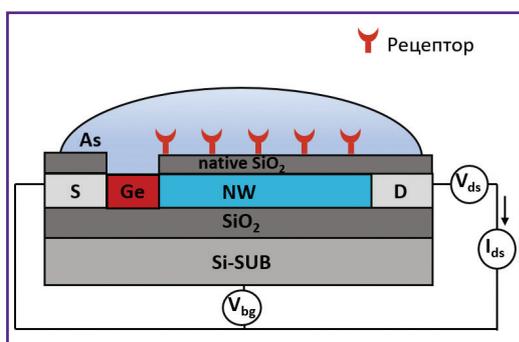


Рис. 3. Конструкция и электрическая принципиальная схема подключения разработанного КНИ-биосенсора:
 S — исток; NW — кремниевая нанопроволока; D — сток; SiO₂ — скрытый диэлектрик; As — анализируемый раствор, содержащий целевые молекулы; Si-SUB — кремниевая подложка, или тыльный затвор; V_{ds} — источник постоянного напряжения в цепи исток–сток; V_{bg} — регулируемый источник напряжения на подзатворе; I_{ds} — амперметр; Ge — электрод заземления; native SiO₂ — слой естественного оксида кремния

КНИ-биосенсоры подключены к источнику постоянного напряжения — V_{ds} (см. рис. 3). Режим работы биосенсора — $V_{ds}=0,15$ В.

Материалы. В работе использовали хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), гидрофосфат динатрия (Na₂HPO₄), дигидрофосфат калия (KH₂PO₄), хлорид магния (MgCl₂), этанол (C₂H₅OH) производства Sigma-Aldrich (США) и рекомбинантный сердечный тропонин I (сТnI) — HyTest (Финляндия).

Высокоспецифичный анти-тропонин I ДНК-аптамер (TnAp12t2) (5'-GGAAGACAAGACATCGGGAGGGAGG GAGGGCAGTCTAGTCTCATGTGTTTCCATGGTTC-3') отобран методом SELEX с использованием биолуминесцентных репортеров для мониторинга обогащения ДНК-библиотек и оценки аффинности полученных кандидатных последовательностей [33]. Константа диссоциации (K_D) комплекса «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер» составила 6×10^{-9} моль/л [33].

Перед экспериментом аптамер термически денатурировали при 90°С в течение 5 мин в связывающем буфере (0,15 моль/л NaCl, 50 ммоль/л K-Na фосфатного буфера (pH=7,0) и 1 ммоль/л MgCl₂). Затем аптамер ренатурировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Растворы TnAp12t2 и сТnI разбавляли дистиллированной водой (pH=5,9) непосредственно перед экспериментом для снижения ионной силы и проводимости растворов [23, 34].

Измерение. Модификацию поверхности КНИ-биосенсора для создания рецепторного слоя осуществляли посредством физической адсорбции [35]. На начальном этапе поверхность биосенсора промывали 96% этанолом, затем дистиллированной водой. Далее на поверхность наносили 5 мкл TnAp12t2 ($C_A=10^{-8}$ моль/л) и инкубировали в течение нескольких минут [36]. Сигналы биосенсора регистрировали непрерывно (в режиме реального времени) на протяжении всего эксперимента. После внесения аптамера и стабилизации сигнала на поверхность добавляли 5 мкл сТnI в диапазоне концентраций $C_T=10^{-11}$ – 10^{-9} моль/л.

Сигналом КНИ-биосенсора служило изменение тока в цепи исток–сток (I_{ds}) при адсорбции биологических молекул, таких как аптамеры или комплекс «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер», на поверхность нанопроволоки. Ток измеряли с помощью амперметра PXIe 4163 (National Instruments, США). Напряжение в цепи исток–сток ($V_{ds}=0,15$ В) поддерживали постоянным с помощью устройства PXI 4135 (National Instruments, США). Напряжение, подаваемое на подзатвор датчика, выбирали в диапазоне $V_{bg}=0$ –30 В. Собранные данные визуализировали в виде временной зависимости тока исток–сток — $I_{ds}(t)$.

Результаты

Временные зависимости тока исток–сток $I_{ds}(t)$ КНИ-биосенсоров представлены на рис. 4. Установлено, что ток шести КНИ-биосенсоров изменялся в ходе эксперимента. Другие четыре КНИ-биосенсора находи-

лись в режиме отсечки (режим полного закрытия) при заданных условиях в течение эксперимента, поэтому их кривые $I_{ds}(t)$ не представлены на рисунке.

Начальные токи биосенсоров различались в момент включения устройства (см. рис. 4). Зарегистрированные значения тока охватывали широкий диапазон: от $I_{ds}=2,1 \times 10^{-7}$ А (КНИ-биосенсор №4, *зеленая линия*) до $I_{ds}=6,1 \times 10^{-8}$ А (КНИ-биосенсор №3, *желтая линия*). В режиме холостого хода (без каких-либо биологических образцов на поверхности биосенсоров) в интервале времени 0–200 с большинство КНИ-биосенсоров демонстрировали стабильное значение I_{ds} , за исключением КНИ-биосенсоров №1 (*красная линия*) и №4 (*зеленая линия*), которые показывали незначительный и заметный дрейф тока соответственно.

Добавление 5 мкл раствора ТпАр12т2 ($C_A=10^{-8}$ моль/л) на поверхность кристалла в точке (1) вызвало увеличение тока только у КНИ-биосенсоров №1 и №4. Подобная реакция биосенсора с n-типом проводимости объясняется увеличением числа носителей заряда, в данном случае электронов, в объеме нанопроволоки. Это вызвано наличием положительного эффективного электрического заряда на границе раздела фаз «жидкий образец–нанопроволока». Поскольку буферный раствор не оказывал влияния на значения тока, положительный заряд связан с адсорбцией аптамера. Возможно, в условиях эксперимента ($pH=5,9$) положительный эффективный электрический заряд аптамера может быть обусловлен протонированием аденина ($pK \sim 3,5$), цитозина ($pK \sim 4,2$) или гуанина ($pK \sim 2,1$) [37–41]. Полученные экспериментальные результаты влияния адсорбции аптамера на величину тока КНИ-биосенсора согласуются с исследованием Т. Farrow с соавт. [42].

Небольшой дрейф тока наблюдался в КНИ-биосенсорах №5 (*синяя линия*) и №6 (*фиолетовая линия*). С другой стороны, КНИ-биосенсоры №2 (*оранжевая линия*) и №3 (*желтая линия*) не показали существенных различий по сравнению с током, наблюдаемым в режиме холостого хода.

В интервале между точками (1) и (2) наблюдалась стабилизация сигнала. Однако в КНИ-биосенсорах №1 и №4 отмечен небольшой дрейф тока, что указывает на динамические процессы, происходящие на их поверхности. Значения остальных биосенсоров остались неизменными.

Добавление 5 мкл раствора сТпI ($C_1=10^{-11}$ моль/л) на поверхность кристалла в точке (2), которая содер-

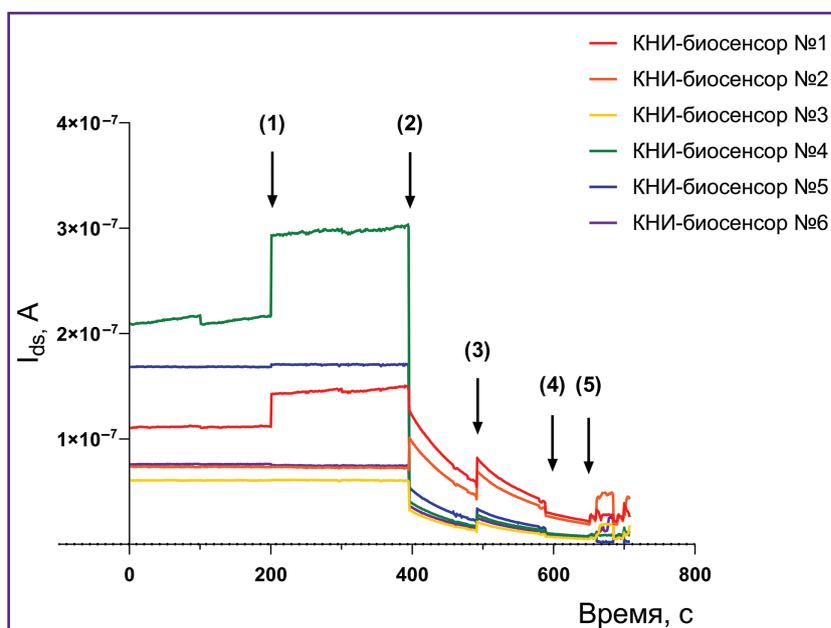


Рис. 4. Временные зависимости тока истока–стока $I_{ds}(t)$ шести КНИ-биосенсоров при обнаружении тропонина I:

(1) добавление 5 мкл 10^{-8} моль/л раствора ТпАр12т2; (2) добавление 5 мкл 10^{-11} моль/л раствора сТпI; (3) повторное добавление 5 мкл 10^{-8} моль/л раствора ТпАр12т2; (4) добавление 5 мкл 10^{-10} моль/л раствора сТпI; (5) добавление 5 мкл 10^{-9} моль/л раствора сТпI. Напряжение в цепи истока–стока $V_{ds}=0,15$ В

жала молекулы ТпАр12т2, приводило к резкому уменьшению значений I_{ds} в КНИ-биосенсорах №1, №3–6 в диапазоне от 10^{-1} до 3,8 А. Это указывает на наличие отрицательного эффективного электрического заряда на границе раздела фаз «жидкий образец–нанопроволока». Поскольку изолированная молекула тропонина ($pI=9,3$) в условиях данного эксперимента имела положительный электрический заряд, можно заключить, что образовавшийся комплекс «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер» имеет отрицательный эффективный электрический заряд на границе раздела фаз [42–44].

Только I_{ds} КНИ-биосенсора №2 увеличилась на 3×10^{-8} А. Увеличение значений I_{ds} КНИ-биосенсора с n-типом проводимости возможно при возникновении положительного электрического заряда на поверхности нанопроволоки. Результаты нашего эксперимента и литературные данные [42–44] показывают, что увеличение значений I_{ds} может быть вызвано адсорбцией аптамера (например, точка (1) на рис. 4) или изолированной молекулы тропонина ($pI=9,3$).

Во временном диапазоне между точками (2) и (3) значения I_{ds} всех КНИ-биосенсоров демонстрировали общую тенденцию изменения.

В точке (3) на поверхность кристалла внесли раствор ТпАр12т2 ($C_A=10^{-8}$ моль/л), что привело к увеличению тока всех КНИ-биосенсоров. Последующее введение 5 мкл раствора сТпI с концентрацией $C_2=10^{-10}$ моль/л в точке (4) привело к снижению I_{ds}

всех шести КНИ-биосенсоров в результате образования новых комплексов «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер». В течение этого временного интервала биосенсоры находились в режиме отсечки, что соответствовало их низкой чувствительности. По этой причине изменения I_{ds} , наблюдаемые в точках (3) и (4), были меньше, чем в точках (1) и (2).

Добавление 5 мкл раствора сТпI ($C_3=10^{-9}$ моль/л) в точке (5) привело к нестабильной работе КНИ-биосенсоров из-за скопления большого количества молекул на их поверхности.

Разброс значений I_{ds} КНИ-биосенсоров может быть связан с технологией изготовления микросхем, которая сказывается на чувствительности биосенсоров. Основанием подобного вывода служит разброс значений I_{ds} шести КНИ-биосенсоров в момент включения устройства и в режиме холостого хода, а также нахождения четырех КНИ-биосенсора в режиме отсечки.

Обсуждение

КНИ-биосенсор представляет собой перспективное аналитическое устройство для детекции целевых молекул без использования меток (флуоресцентных, люминесцентных). Он обладает высокой чувствительностью и способностью регистрировать сигнал в режиме реального времени [11]. Тем не менее существуют определенные факторы, усложняющие его применение. Одним из таких факторов является топология и конструкция биосенсора. В настоящей работе использован КНИ-биосенсор с электродами заземления, расположенными непосредственно на поверхности кристалла микросхемы (см. рис. 2, а). Десять КНИ-биосенсоров на кристалле увеличивают вероятность попадания целевых молекул на поверхность нанопроволоки, повышая достоверность результатов детекции.

Важной составляющей эффективной детекции с помощью биосенсора является наличие рецепторного слоя, а также возможность выбора вида рецепторов и метода их иммобилизации. В настоящее время для детекции сТпI преимущественно применяют моноклональные антитела. Синтетические последовательности нуклеиновых кислот (аптамеры) предоставляют альтернативный подход. По специфичности взаимодействия аптамеры сравнимы с антителами. Их можно получить с помощью эволюционного подхода *in vitro* (SELEX) без использования клеточных линий. Они могут восстанавливать свою активность после термической денатурации и ренатурации, проявляют высокую стабильность в жестких условиях эксплуатации. Более того, аптамеры можно синтезировать и модифицировать химическим путем [31, 42], что делает их более выгодными с точки зрения временных и материальных затрат. Аптамеры также способны связываться с целевыми молекулами в растворах с высокой ионной силой, что позволяет обнаруживать белки в неразбавленных биологических образцах, та-

ких как сыворотка, кровь и т.д. [23, 42]. В исследовании разработан и использован в качестве рецептора высокоспецифичный анти-тропонин I ДНК-аптамер (ТпАp12t2); константа диссоциации (K_D) комплекса «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер» составила 6×10^{-9} моль/л. Иммобилизацию аптамера проводили методом физической адсорбции, что позволило сохранить его пространственную конфигурацию и реакционную способность при одновременном сокращении времени подготовки биосенсора к работе.

В данной работе продемонстрировано определение сердечного тропонина I в клиническом диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-9} моль/л с помощью разработанной конструкции КНИ-биосенсора в режиме реального времени без использования специальных меток. Установлено, что детекция одной пробы с помощью КНИ-биосенсора составляет примерно 200 с. Следует отметить, что высокие концентрации целевых молекул могут привести к выходу биосенсора в режим насыщения и неверным результатам (точка (5) на рис. 4). Обнаружение целевых молекул в низких концентрациях осложнено вероятностью их адсорбции на поверхности биосенсора. Например, добавление раствора аптамера на поверхность кристалла в точке (1) (см. рис. 4) не меняет значение I_{ds} КНИ-биосенсоров №2, 3, 5 и 6. Предполагается, что в этом случае молекулы аптамера не адсорбируются на поверхности. Таким образом, вероятность адсорбции молекул-рецепторов или целевых молекул является ключевым фактором при проведении анализа посредством биосенсора [13, 32]. Теоретическое исследование процесса детекции молекул-мишеней с помощью КНИ-биосенсора обсуждается в ранее опубликованной статье [45].

Заключение

Разработанный КНИ-биосенсор позволяет осуществлять детекцию тропонина I без использования меток в режиме реального времени. Детекция одной пробы тропонина I с помощью КНИ-биосенсора занимает примерно 200 с. Чувствительность биосенсора — $\sim 10^{-11}$ моль/л белка. Установлено, что иммобилизация аптамера методом физической адсорбции позволяет сохранять его реакционную способность. Высокоспецифичный анти-тропонин I ДНК-аптамер (ТпАp12t2) проявил в условиях эксперимента положительный эффективный электрический заряд на разделе фаз «жидкая проба–нанопроволока». Комплекс «тропонин I + анти-тропонин I ДНК-аптамер» имел отрицательный эффективный электрический заряд на том же разделе.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Роспотребнадзора ГЗ-21/21 и Государственного задания бюджетной темы «Изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распростра-

ненных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их ранней диагностике и профилактике», 2024–2028 гг. (FWNR-2024-0002), а также в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект №FWES-2022-0002).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликтов интересов.

Литература/References

1. Всемирная организация здравоохранения. *10 ведущих причин смерти в мире*. 9 декабря 2020 г. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- World Health Organization. *The top 10 causes of death*. December 9, 2020. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Снежицкий В.А., Ёрш И.Р., Голышко В.С., Литвинович С.Н. *Инфаркт миокарда: патофизиологические механизмы развития, диагностическая стратегия и тактика лечения*. Гродно: Гродненский государственный медицинский университет; 2015; 328 с.
- Snezhitsky V.A., Yorsh I.R., Golyshko V.S., Litvinovich S.N. *Infarkt miokarda: patofiziologicheskie mekhanizmy razvitiya, diagnosticheskaya strategiya i taktika lecheniya* [Myocardial infarction: pathophysiological mechanisms of development, diagnostic strategy, and tactics of treatment]. Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2015; 328 p.
3. Pan T.M., Wang C.W., Weng W.C., Lai C.C., Lu Y.Y., Wang C.Y., Hsieh I.C., Wen M.S. Rapid and label-free detection of the troponin in human serum by a TiN-based extended-gate field-effect transistor biosensor. *Biosens Bioelectron* 2022; 201: 113977, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.113977>.
4. Ojha N., Dharamoon A.S. *Myocardial infarction*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. URL: https://europepmc.org/article/nbk/nbk537076#_article-25460_s13_.
5. Gerhardt W., Nordin G., Ljungdahl L. Can troponin T replace CK MBmass as “gold standard” for acute myocardial infarction (“AMI”)? *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999; 230: 83–89, <https://doi.org/10.1080/00365519909168331>.
6. Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L., Newby L.K., Ravkilde J., Storrow A.B., Wu A.H.B., Christenson R.H., Apple F.S., Francis G., Tang W.; National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007; 115(13): e356–e375, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.182882>.
7. Daubert M.A., Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 691–699, <https://doi.org/10.2147/vhrm.s5306>.
8. Dhara K., Mahapatra D.R. Review on electrochemical sensing strategies for C-reactive protein and cardiac troponin I detection. *Microchem J* 2020; 156: 104857, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104857>.
9. Kong T., Su R., Zhang B., Zhang Q., Cheng G. CMOS-compatible, label-free silicon-nanowire biosensors to detect cardiac troponin I for acute myocardial infarction diagnosis. *Biosens Bioelectron* 2012; 34(1): 267–272, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.019>.
10. Sharma S., Jackson P.G., Makan J. Cardiac troponins. *J Clin Pathol* 2004; 57(10): 1025–1026, <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015420>.
11. Oliveira D.C.d.B., Costa F.H.M., da Silva J.A.F. The integration of field effect transistors to microfluidic devices. *Micromachines (Basel)* 2023; 14(4): 791, <https://doi.org/10.3390/mi14040791>.
12. George Kerry R., Ukhurebor K.E., Kumari S., Maurya G.K., Patra S., Panigrahi B., Majhi S., Rout J.R., Rodriguez-Torres M.d.P., Das G., Shin H.S., Patra J.K. A comprehensive review on the applications of nano-biosensor-based approaches for non-communicable and communicable disease detection. *Biomater Sci* 2021; 9(10): 3576–3602, <https://doi.org/10.1039/d0bm02164d>.
13. Tran D.P., Pham T.T.T., Wolfrum B., Offenhäusser A., Thierry B. CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistor biosensor: technology development toward commercialization. *Materials (Basel)* 2018; 11(5): 785, <https://doi.org/10.3390/ma11050785>.
14. Kim K., Park C., Kwon D., Kim D., Meyyappan M., Jeon S., Lee J.S. Silicon nanowire biosensors for detection of cardiac troponin I (cTnI) with high sensitivity. *Biosens Bioelectron* 2016; 77: 695–701, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.008>.
15. De Moraes A.C.M., Kubota L.T. Recent trends in field-effect transistors-based immunosensors. *Chemosensors* 2016; 4(4): 20, <https://doi.org/10.3390/chemosensors4040020>.
16. Generalov V.M., Naumova O.V., Fomin B.I., P'yankov S.A., Khlistun I.V., Safatov A.S., Zaitsev B.N., Zaitseva E.G., Aseev A.L. Detection of Ebola virus VP40 protein using a nanowire SOI biosensor. *Optoelectron Instrum Data Process* 2019; 55: 618–622, <https://doi.org/10.3103/s875669901906013x>.
17. Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C.M. Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(39): 14017–14022, <https://doi.org/10.1073/pnas.0406159101>.
18. Panahi A., Sadighbayan D., Forouhi S., Ghafar-Zadeh E. Recent advances of field-effect transistor technology for infectious diseases. *Biosensor (Basel)* 2021; 11(4): 103, <https://doi.org/10.3390/bios11040103>.
19. Wadhwa T., Kakkar D., Wadhwa G., Raj B. Recent advances and progress in development of the field effect transistor biosensor: a review. *J Electron Mater* 2019; 48: 7635–7646, <https://doi.org/10.1007/s11664-019-07705-6>.
20. Sadighbayan D., Hasanzadeh M., Ghafar-Zadeh E. Biosensing based on field-effect transistors (FET): recent progress and challenges. *Trends Analyt Chem* 2020; 133: 116067, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116067>.
21. Cetin Y., Aydinlik S., Gungor A., Kan T., Avsar T., Durdagi S. Review on in silico methods, high-throughput screening techniques, and cell culture based in vitro assays for SARS-CoV-2. *Curr Med Chem* 2020; 29(38): 5925–5948, <https://doi.org/10.2174/0929867329666220627121416>.
22. Chiang P.L., Chou T.C., Wu T.H., Li C.C., Liao C.D., Lin J.Y., Tsai M.H., Tsai C.C., Sun C.J., Wang C.H., Fang J.M., Chen Y. T. Nanowire transistor-based ultrasensitive virus detection with reversible surface functionalization. *Chem Asian J* 2012; 7(9): 2073–2079, <https://doi.org/10.1002/asia.201200222>.
23. Thriveni G., Ghosh K. Advancement and challenges of biosensing using field effect transistors. *Biosensors (Basel)* 2022; 12(8): 647, <https://doi.org/10.3390/bios12080647>.

24. Bulgakova A., Berdyugin A., Naumova O., Fomin B., Pyshnyi D., Chubarov A., Dmitrienko E., Lomzov A. Solution pH effect on drain-gate characteristics of SOI FET biosensor. *Electronics* 2023; 12(3): 777, <https://doi.org/10.3390/electronics12030777>.
25. Vance S.A., Sandros M.G. Zeptomole detection of C-reactive protein in serum by a nanoparticle amplified surface plasmon resonance imaging aptasensor. *Sci Rep* 2014; 4: 5129, <https://doi.org/10.1038/srep05129>.
26. Yang X., Wang Y., Wang K., Wang Q., Wang P., Lin M., Chena N., Tan Y. DNA aptamer-based surface plasmon resonance sensing of human C-reactive protein. *RSC Adv* 2014; 4(58): 30934–30937, <https://doi.org/10.1039/c4ra05011h>.
27. Lin M.C., Nawarak J., Chen T.Y., Tsai H.Y., Hsieh J.F., Sinchaikul S., Chen S.T. Rapid detection of natriuretic peptides by a microfluidic LabChip analyzer with DNA aptamers: application of natriuretic peptide detection. *Biomicrofluidics* 2009; 3(3): 34101, <https://doi.org/10.1063/1.3194283>.
28. Pur M.R.K., Hosseini M., Faridbod F., Ganjali M.R. Highly sensitive label-free electrochemiluminescence aptasensor for early detection of myoglobin, a biomarker for myocardial infarction. *Microchim Acta* 2017; 184: 3529–3537, <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2385-y>.
29. Jo H., Her J., Lee H., Shim Y.B., Ban C. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes. *Talanta* 2017; 165: 442–448, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.091>.
30. Negahdary M., Behjati-Ardakani M., Sattarahmady N., Yadegari H., Heli H. Electrochemical aptasensing of human cardiac troponin I based on an array of gold nanodumbbells — applied to early detection of myocardial infarction. *Sens Actuators B Chem* 2017; 252: 62–71, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.149>.
31. Chandola C., Kalme S., Casteleijn M.G., Urtti A., Neerathilingam M. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J Biosci* 2016; 41(3): 535–561, <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9632-y>.
32. Squires T.M., Messinger R.J., Manalis S.R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat Biotechnol* 2008; 26(4): 417–426, <https://doi.org/10.1038/nbt1388>.
33. Krasitskaya V.V., Goncharova N.S., Biriukov V.V., Bashmakova E.E., Kabilov M.R., Baykov I.K., Sokolov A.E., Frank L.A. The Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as a tool for SELEX monitoring and DNA aptamer affinity evaluation. *Photochem Photobiol* 2020; 96(5): 1041–1046, <https://doi.org/10.1111/php.13274>.
34. Stern E., Wagner R., Sigworth F.J., Breaker R., Fahmy T.M., Reed M.A. Importance of the Debye screening length on nanowire field effect transistor sensors. *Nano Lett* 2007; 7(11): 3405–3409, <https://doi.org/10.1021/nl071792z>.
35. Генералов В.М., Наумова О.В., Пьянков С.А., Колосова И.В., Сафатов А.С., Зайцев Б.Н., Зайцева Э.Г., Бу-
ряк Г.А., Черемискина А.А., Филатова Н.А., Асеев А.Л. Индикация вируса осповакцины с помощью нанопроволочного КНИ-биосенсора. *Автометрия* 2021; 57(1): 42–49, <https://doi.org/10.15372/aut20210105>.
- Generalov V.M., Naumova O.V., P'yankov S.A., Kolosova I.V., Safatov A.S., Zaytsev B.N., Zaytseva E.G., Buryak G.A., Cheremiskina A.A., Filatova N.A., Aseev A.L. Indication of the vaccinia virus by a nanowire silicon-on-insulator biosensor. *Avtometriya* 2021; 57(1): 42–49, <https://doi.org/10.15372/aut20210105>.
36. Ocaña C., del Valle M. A comparison of four protocols for the immobilization of an aptamer on graphite composite electrodes. *Microchim Acta* 2014; 181: 355–363, <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1126-0>.
37. Tan S.Y., Acquah C., Tan S.Y., Ongkudon C.M., Danquah M.K. Characterisation of charge distribution and stability of aptamer-thrombin binding interaction. *Process Biochem* 2017; 60: 42–51, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.003>.
38. Kantor C.R., Schimmel P.R. *Biophysical chemistry: part I: the conformation of biological macromolecules. 1st edition*. W.H. Freeman and Company; 1980.
39. Ravindranathan S., Butcher S.E., Feigon J. Adenine protonation in domain B of the hairpin ribozyme. *Biochemistry* 2000; 39(51): 16026–16032, <https://doi.org/10.1021/bi001976r>.
40. Кочетков Н.К., Будовский Э.П., Свердлов Е.Д., Симукова Н.К., Турчинский М.Ф., Шибает В.Н. *Органическая химия нуклеиновых кислот*. М: Химия; 1970.
- Kochetkov N.K., Budovskiy E.P., Sverdlov E.D., Simukova N.K., Turchinskiy M.F., Shibaev V.N. *Organicheskaya khimiya nukleinykh kislot* [Organic chemistry of nucleic acids]. Moscow: Khimiya; 1970.
41. Шабарова З.А., Богданов А.А. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. М: Химия; 1978; с. 584.
- Shabarova Z.A., Bogdanov A.A. *Khimiya nukleinykh kislot i ikh komponentov* [Chemistry of nucleic acids and their components]. Moscow: Khimiya; 1978; p. 584.
42. Farrow T., Laumier S., Sandall I., van Zalinge H. An aptamer-functionalized Schottky-field effect transistor for the detection of proteins. *Biosensors (Basel)* 2022; 12(5): 347, <https://doi.org/10.3390/bios12050347>.
43. Filatov V.L., Katrukha A.G., Bulargina T.V., Gusev N.B. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc)* 1999; 64: 969–985.
44. *Сердечный тропонин I*. HyTest; 2019. URL: https://hytest.ru/sites/5cd13840ff4f702c0cbc4c8d/assets/5da43ec3fd7fb419e85444c7/Troponin_Booklet_2019.pdf.
- Serdechnyy troponin I* [Cardiac troponin I]. HyTest; 2019. URL: https://hytest.ru/sites/5cd13840ff4f702c0cbc4c8d/assets/5da43ec3fd7fb419e85444c7/Troponin_Booklet_2019.pdf.
45. Generalov V., Cheremiskina A., Glukhov A., Grabezova V., Kruchinina M., Safatov A. Investigation of limitations in the detection of antibody+ antigen complexes using the silicon-on-insulator field-effect transistor biosensor. *Sensors (Basel)* 2023; 23(17): 7490, <https://doi.org/10.3390/s23177490>.