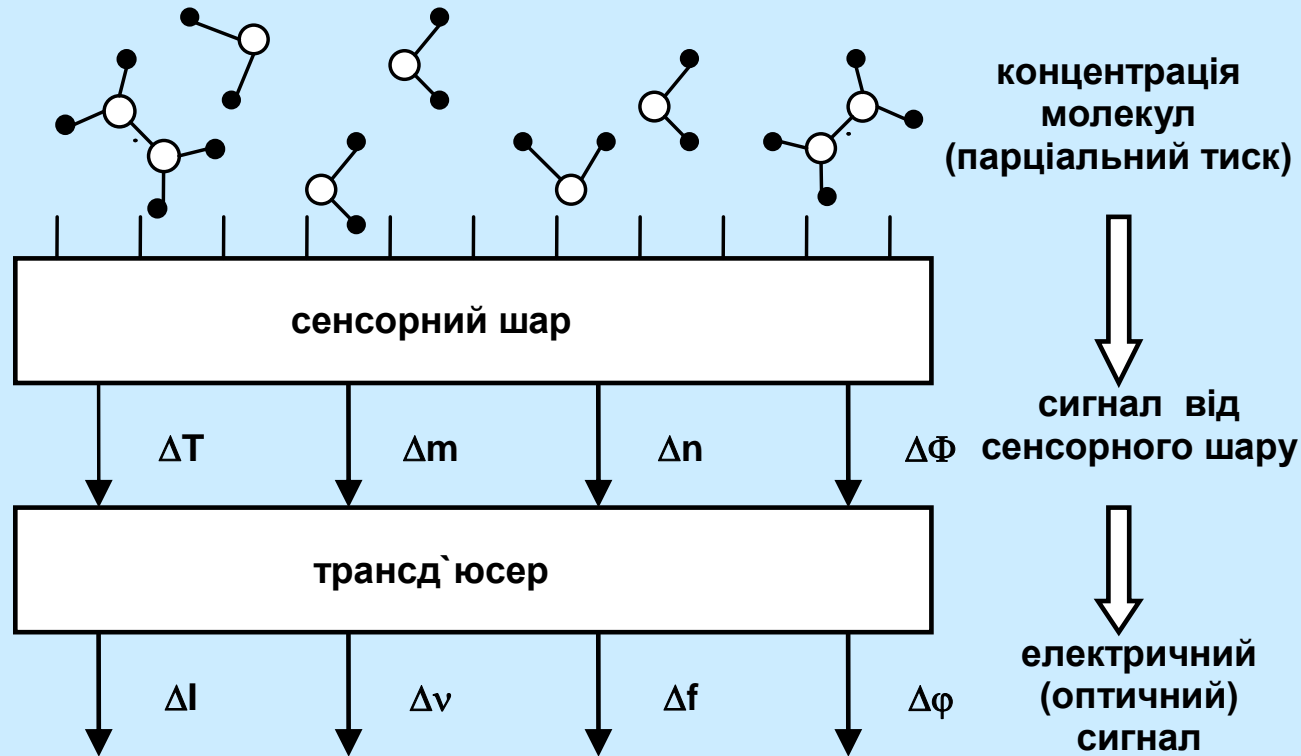




# Напівпровідникові біосенсори

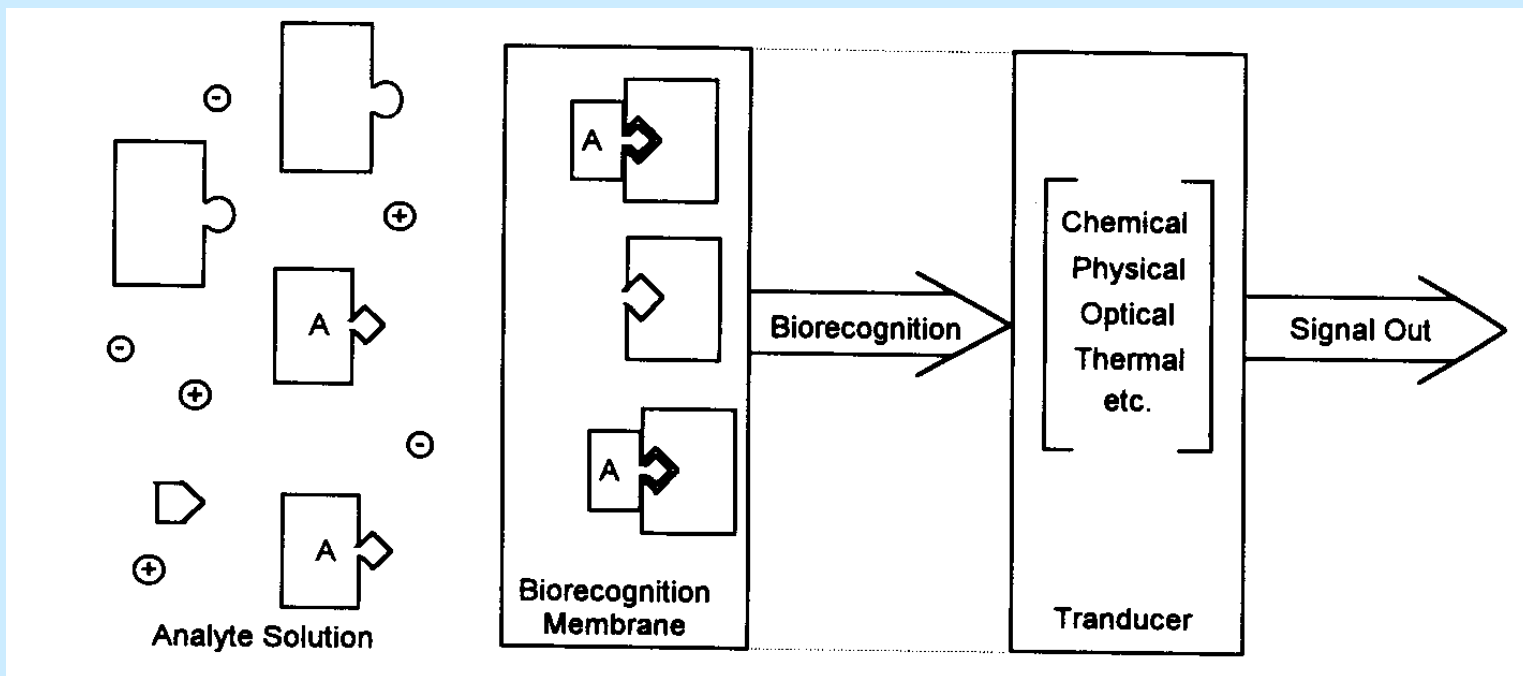
**Prof. Valeri SKRYSHEVSKY**

## ЩО ТАКЕ БІОСЕНСОР?



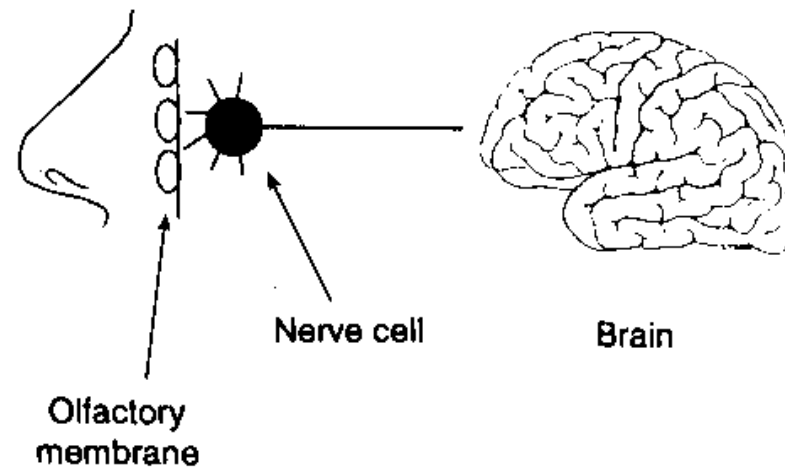
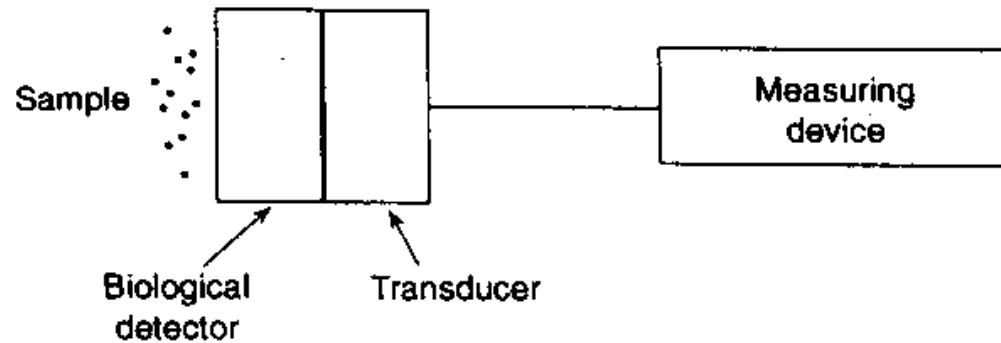
Схема, яка пояснює принцип дії хімічного сенсора

**Біосенсори- це спеціальний клас хімічних сенсорів, які мають властивості високої селективності та чутливості до біологічно активних речовин.**



Схема, яка ілюструє принцип дії біосенсора. Він складається зі звичайного трансдюсера з біо-розпізнаваючою мембраною у тісному контакті з трансдюсером. Біоактивний матеріал розпізнає аналітичну молекулу «А» завдяки специфічному розпізнаванню за формою. В біосенсорі на основі **біо-спорідненості** зв'язування аналітичної та біоактивної молекули дає хімічний сигнал, який детектується трансдюсером. В **метаболичному біосенсорі** біоактивний матеріал перетворює аналіт та інші ко-реактанти в молекули продуктів. Трансдюсер перетворює результат цієї реакції у вихідний сигнал

## Ніс як біосенсор



**ніс → нюхальна мембрана → нюхові цибулини → нюховий  
нейрон → нерве волокно → мозок**

**запах → розпізнавання → електричний сигнал → інтерпретація**

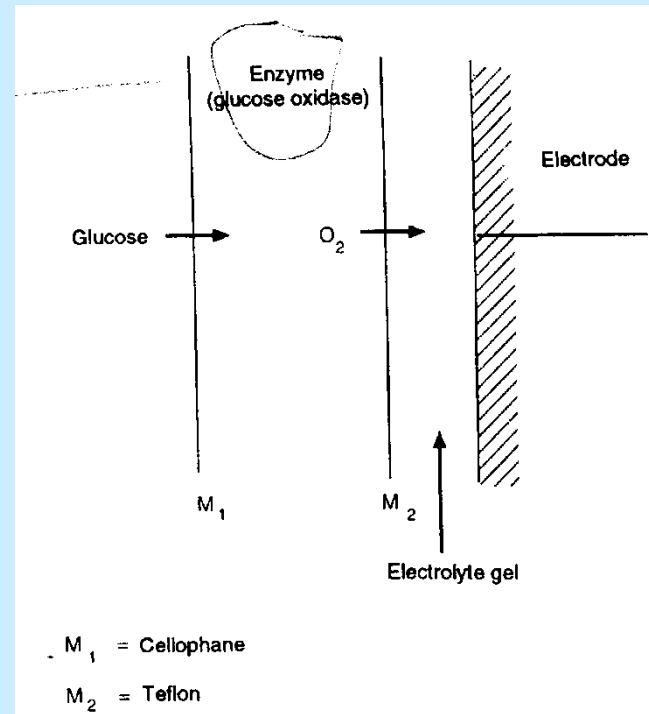
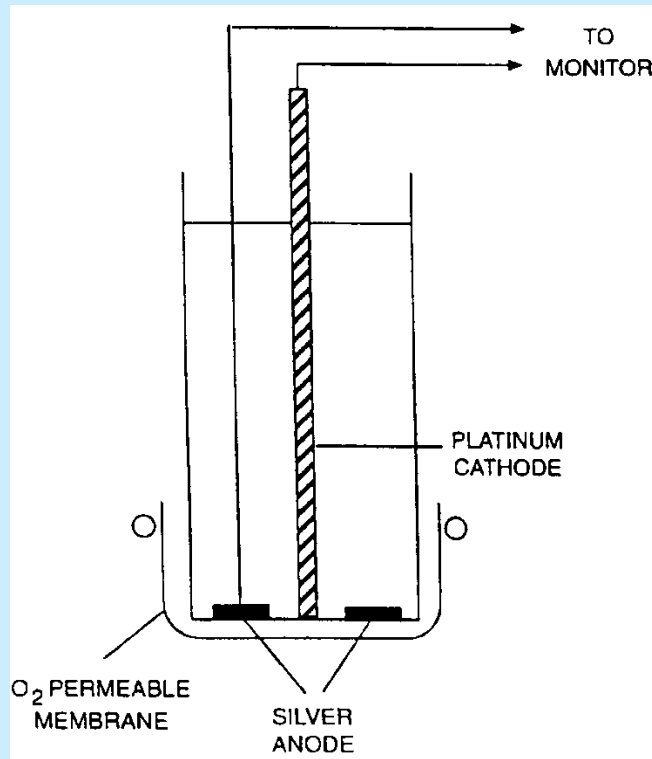
## БИОМАТЕРІАЛИ ТА ВЛАСТИВОСТІ БІОСЕНСОРІВ

*Таблиця. Класи біоматеріалів, які можуть розпізнаватися та деякі їх приклади*

| Аналіт                        | Приклади                                     |
|-------------------------------|--|
| Метаболічні хімікалії         | Кисень, метан, етанол,....                   |
| Ензимні (ферментні) субстрати | Глюкоза, пеніцилін, уреа                     |
| Ліганди                       | Нейротрансмітери, гормони, феромони, токсини |
| Антігени та антітіла          | Людський Ig, людський анти-Ig                |
| Нуклеїнові кислоти            | ДНК, РНК                                     |

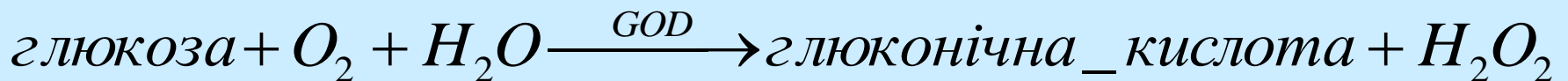
| Біоелемент                  | Тип трансдюсера      | Приклад трансдюсера                                   |
|-----------------------------|----------------------|---|
|                             | Електрохімічний:     |   |
| тканини клітини             | А) потенціометричний | Іонно-селективний польовий транзистор, мікроелектроди |
| органели                    | Б) амперометричний   | мікроелектроди  |
| мембрани                    | В) імпедансний       | мікроелектроди  |
| ензими                      | оптичний             | Волоконні оптоди та люмінесценція                     |
| рецептори                   | калориметричний      | Термістори та термопари                               |
| антітіла нуклеїнові кислоти | акустичний           | Поверхневі та об'ємні акустичні хвилі, мікробаланс    |

### 3. ПЕРШІ БІОСЕНСОРИ

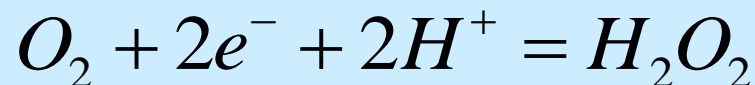


Кисневий електрод Кларка (а) та схема процесів в біосенсорі Кларка для глюкози (б) 1962.  
Вимірюється струм пропорційний концентрації кисню

Реакція оксидації глюкози при використанні каталізатора глюкози-оксидази (GOD):



На Pt електроді:



Основні параметри сенсора (Yellow Spring Instrument, 1974):

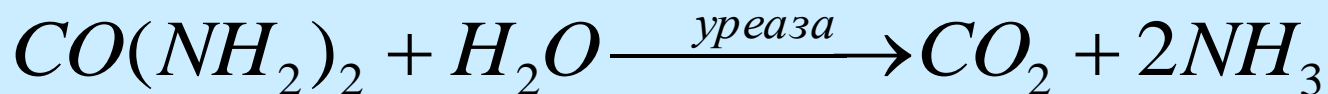
Область концентрацій глюкози- <1-30 мМ.

Час відповіді- 1-1,5 хв.

Час відновлювання- 0,5 хв.

Час життя сенсора- декілька місяців

Біосенсор на сечовину (основна компонента урину) оснований на використанні ензиму уреази, в результаті гідролітичного розриву сечовини утворюється аміак та двооксид вуглецю (1969, Гуїлболт і Монталво ):



Концентрація аміаку вимірюється на іонно-селективному електроді для аміаку (вимірюється напруга на електроді при відсутності струму). Напруга на електроді пропорційна логарифму концентрації аміаку, який прямо пропорційний концентрації сечовини. Іонно-селективний електрод для аміаку – це модифікований скляний рН-електрод

Область вимірюваних концентрацій сечовини-  $3 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-2} \text{М}$

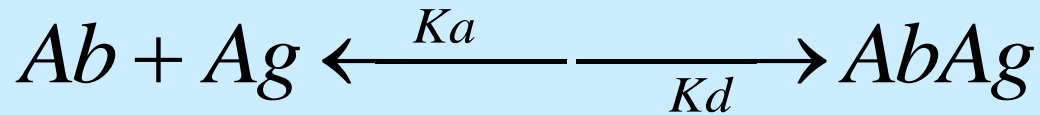
Час відповіді- 1-5 хв.

Час відновлювання- 5-10 хв. (може бути зменшений за рахунок покращеної іммобілізації, що дозволяє проводити до 20 аналізів за годину).

Час життя сенсора- 60 днів.

## БІОРОЗПІЗНАВАННЯ. РІВНЯННЯ МІХАЕЛІСА-МЕНТОНА

Для біо-розпізнавальних процесів за методом біо-спорідненості:



$$K = \frac{Ka}{Kd} = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$

Якщо фіксується концентрація антитіл

$$[Ab]_{заг} = [Ab]_{рівн} + [AbAg]_{рівн}$$

$$[AbAg]_{рівн} = \left( \frac{[Ag]_{рівн}}{\frac{1}{K} + [Ag]_{рівн}} \right) [Ab]_{заг}$$

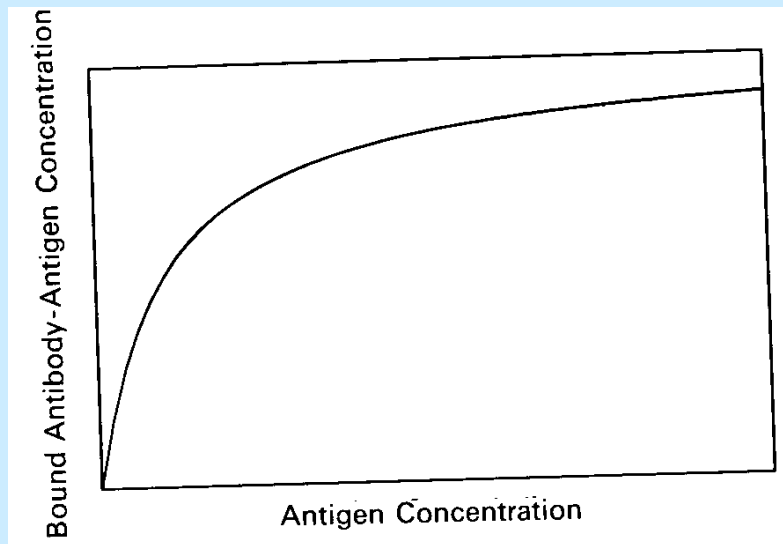
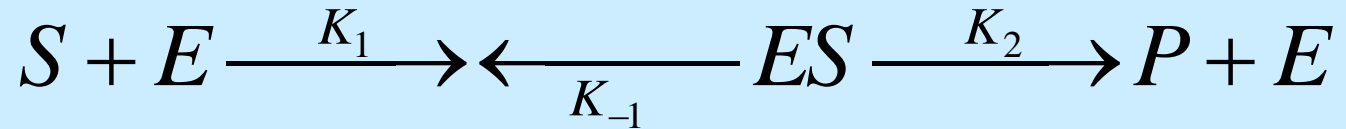


Рис.1.4 Рівноважна концентрація зв'язаного комплексу антитіло - антиген як функція концентрації антигену в системі з фіксованою концентрацією антитіла в мембрані



## Система ензим - субстрат



В ензимних біосенсорах ензим іммобілізується в мембрані на поверхні трансдюсера.

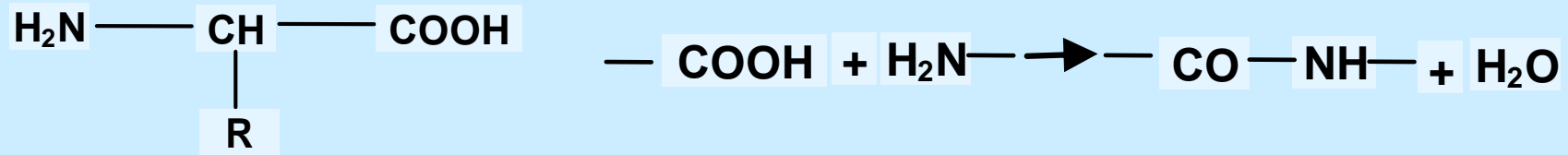
$$[E]_{заг} = [E]_{piв} + [ES]_{piв} \quad V = \frac{\partial [P]}{\partial t} = K_2 [ES]$$

$$\frac{\partial [ES]}{\partial t} = K_1 [E][S] - K_{-1} [ES] - K_2 [ES] = 0$$

$$V = \frac{K_2 [E]_{заг} [S]}{([S] + K_M)}$$

$$K_M = \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1}$$

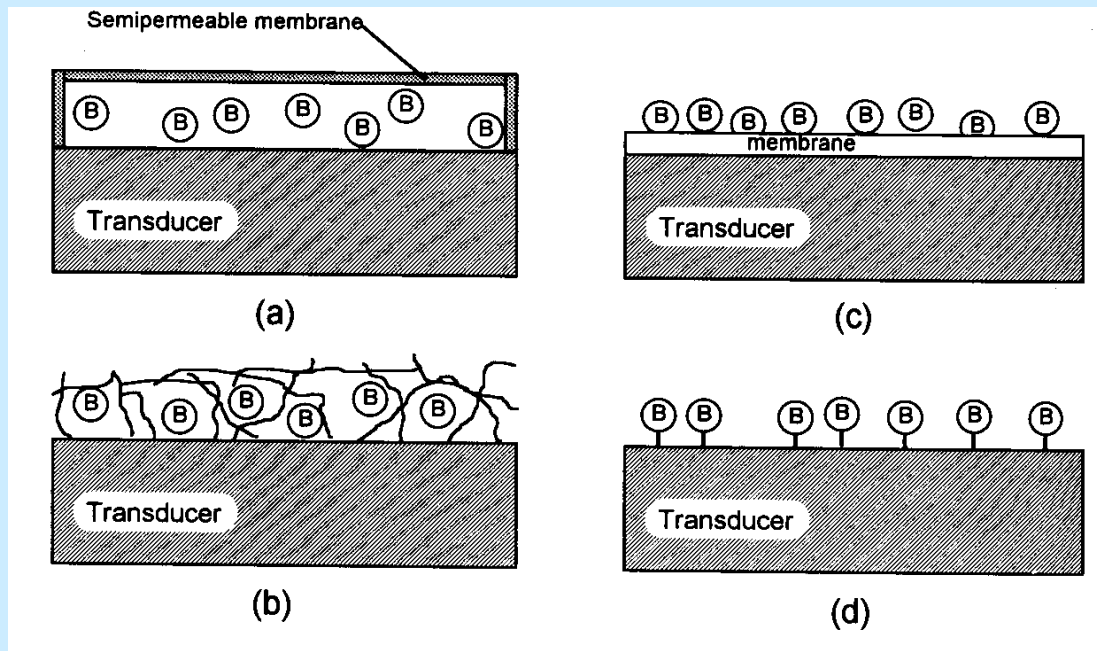
## ІМОБІЛІЗАЦІЯ БІОЕЛЕМЕНТІВ



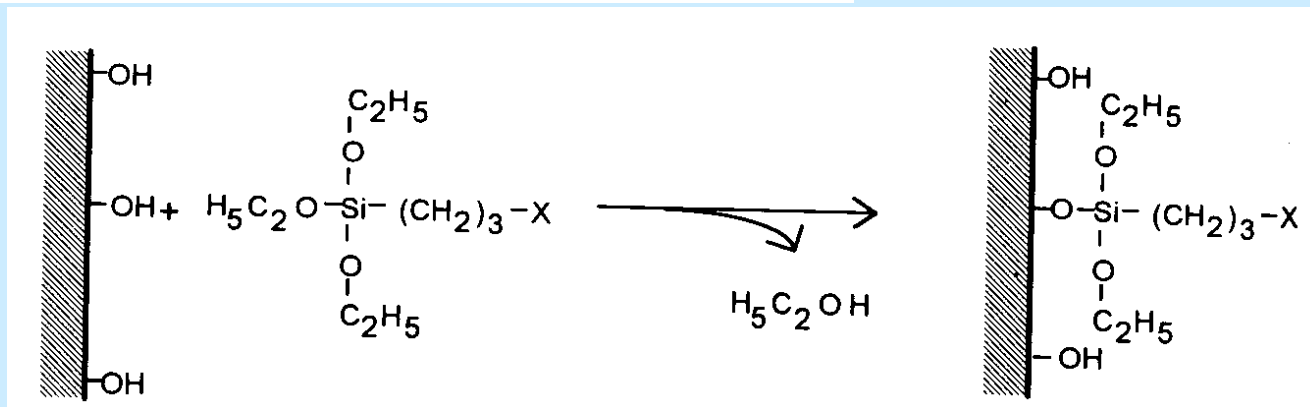
Загальна схема протеїну для всіх 20 природніх протеїнових одиниць, які відрізняються тільки функціональною групою R(а) та утворення поліпептидного ланцюга за рахунок взаємодії **аміногрупи** та **карбоксильної** групи (б)

### Основні вимоги до імобілізації:

- сумісність біоактивного матеріалу з трансдюсером і утримання його протягом часу роботи біосенсору;
- можливість контакту з розчином аналіту;
- можливість дифузії будь-якого продукту від імобілізованого шару;
- відсутність ефекту денатурації біоактивного матеріалу.

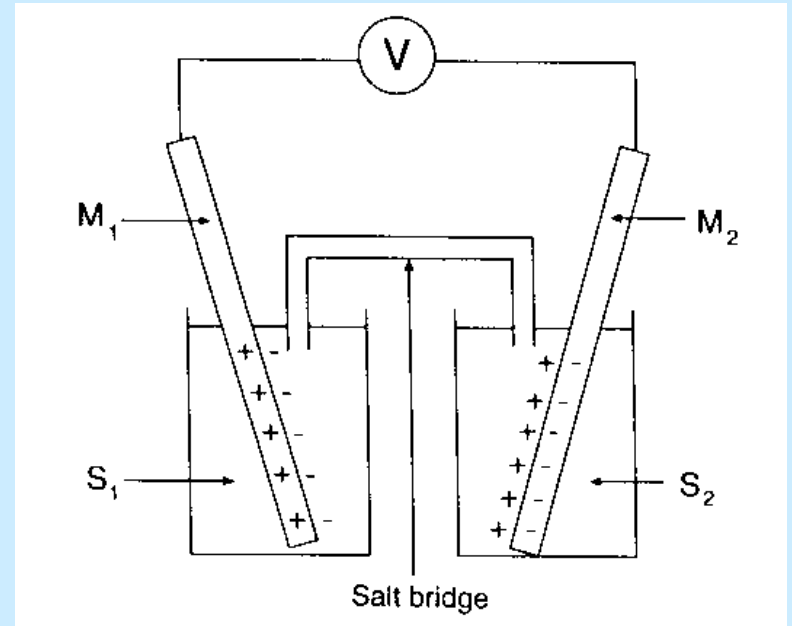
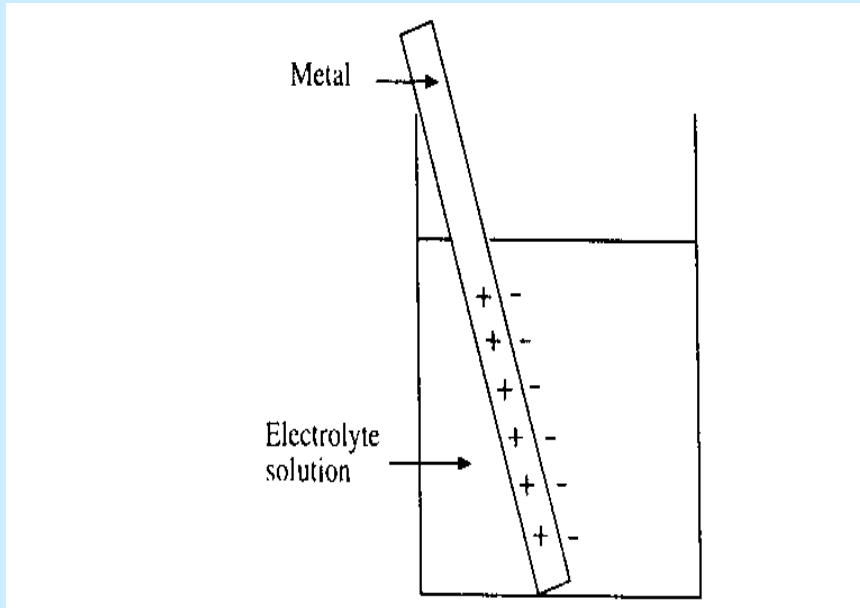


Імобілізаційні схеми: а) захоплення в мембрані, б) захоплення в матриці, в) фізична адсорбція, г) ковалентний зв'язок. «В» позначає біоактивний матеріал, який може включати антітіла, ензими, рецептори, органи, клітини, тканин та організми



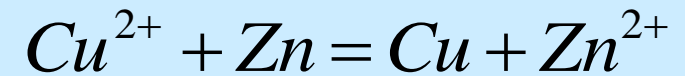
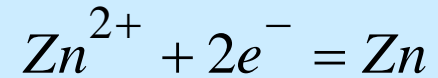
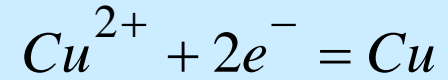
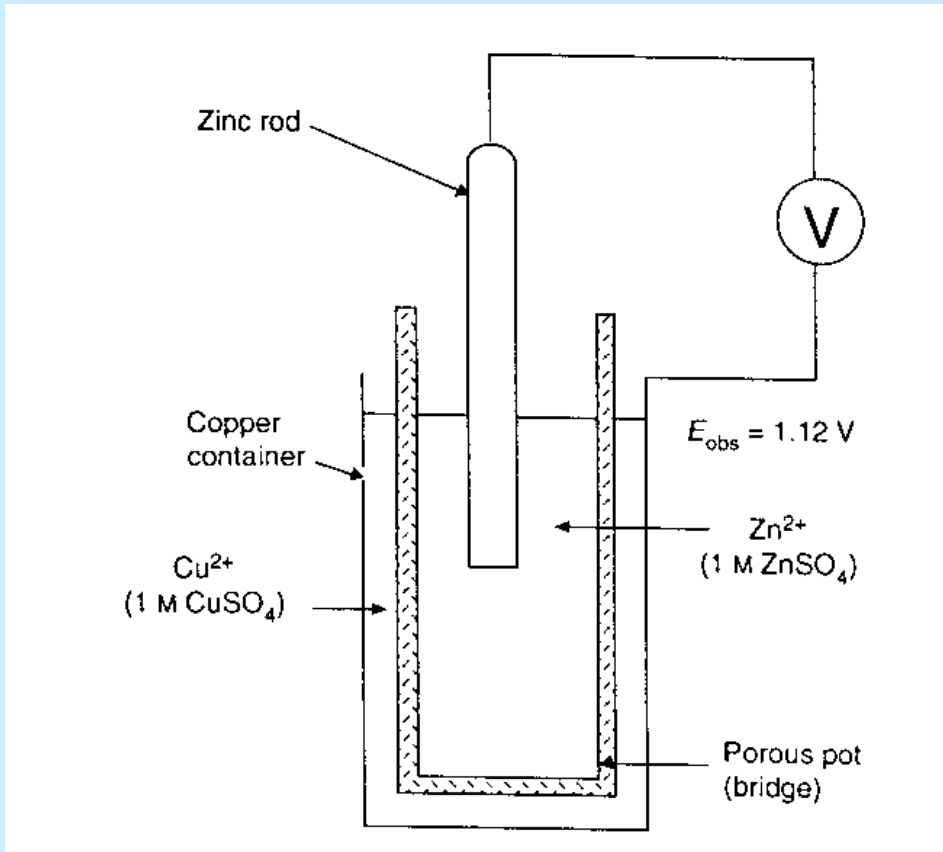
Поверхнева обробка поверхні (наприклад, SiO<sub>2</sub>), яка закінчується гідроксилами для ковалентної імобілізації протеїну, використовуючи алкіл етоксисілан. Кінцева група «X» може бути реактивною групою такою як аміно-, ціано- тощо

## ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ ТРАНСДУСЕРИ



Напівкомірка, яка складається з електроліта та електрода (а) і ціла електрохімічна комірка (б).

## Комірка Данієла

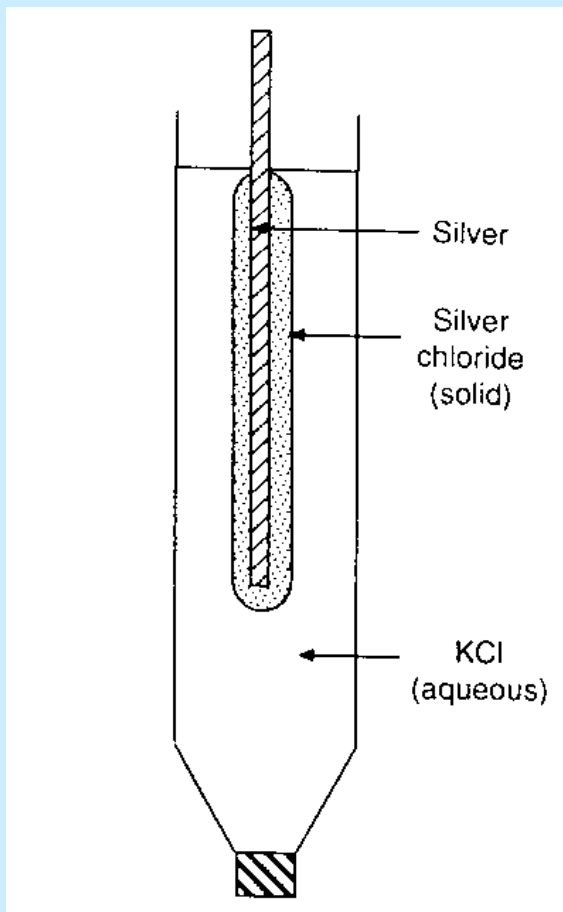


$$E_e = 1.1 \text{ V}$$

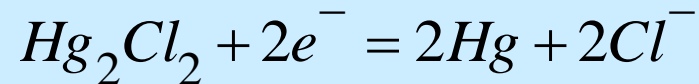
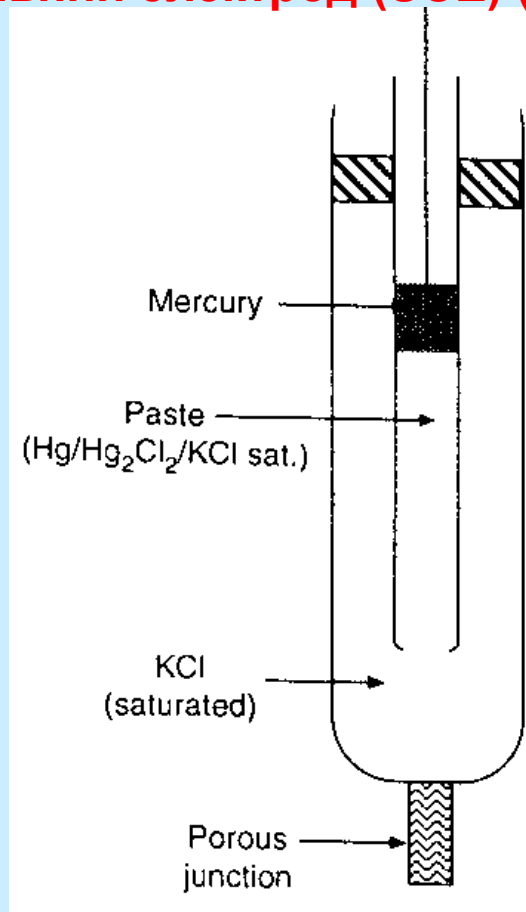
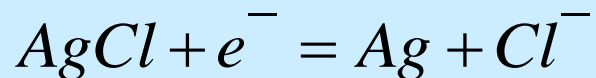
Вільна енергія Гібса

$$\Delta G = -nFE$$

**Ag/AgCl референтний електрод (а)  
та насичений каломельний електрод (SCE) (б)**



$$E_e = +0,22 \text{ B}$$



$$E_e = +0,24 \text{ B}$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$

рівняння Нернста

$$Ox + ne^- = R$$
$$E = E_e + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{Ox}}{a_R} \right)$$

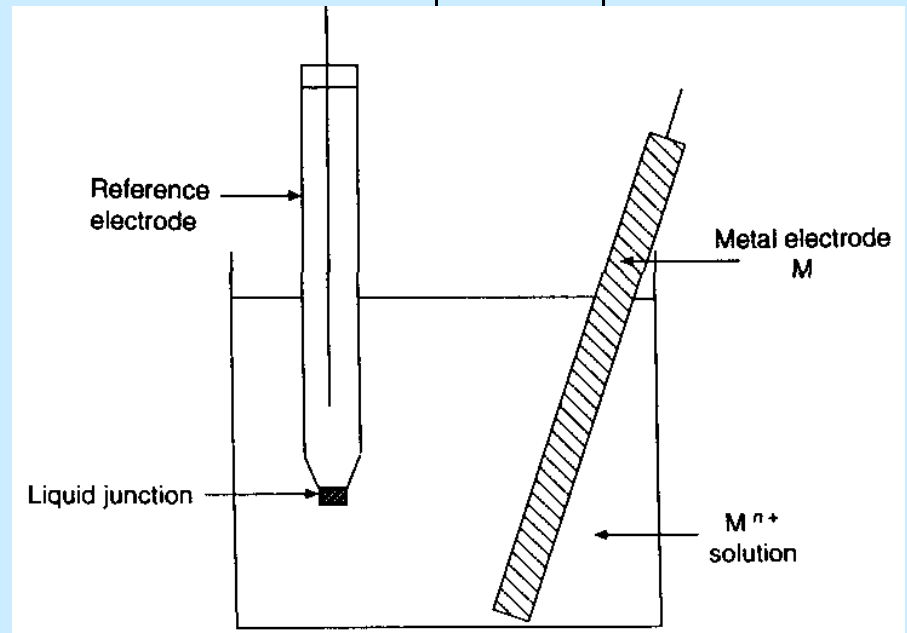
рівняння Хендерсона-Хасельбаха

$$E = E_e + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \left( \frac{[Ox]}{[R]} \right)$$

$$E = E_e + 0,06 \log \left( \frac{[Ox]}{[R]} \right)$$

$$E = E_e + 0,06 \log [Ox]$$

$$pH = pK_a + \log \left( \frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$



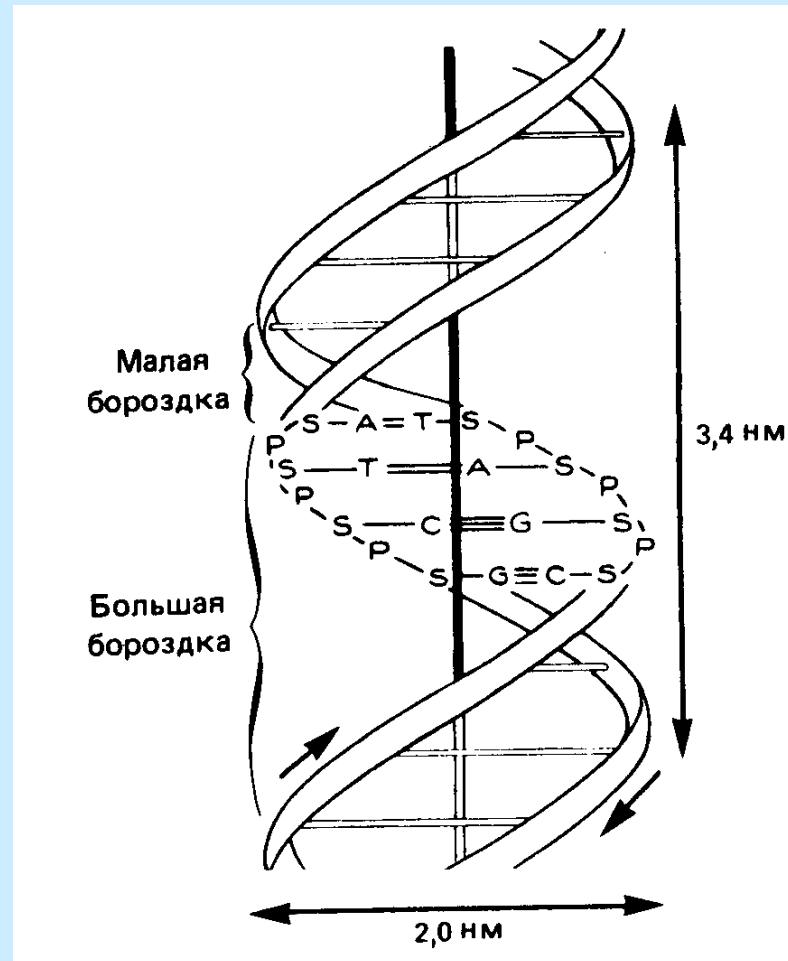
# WHAT IS A DNA ?



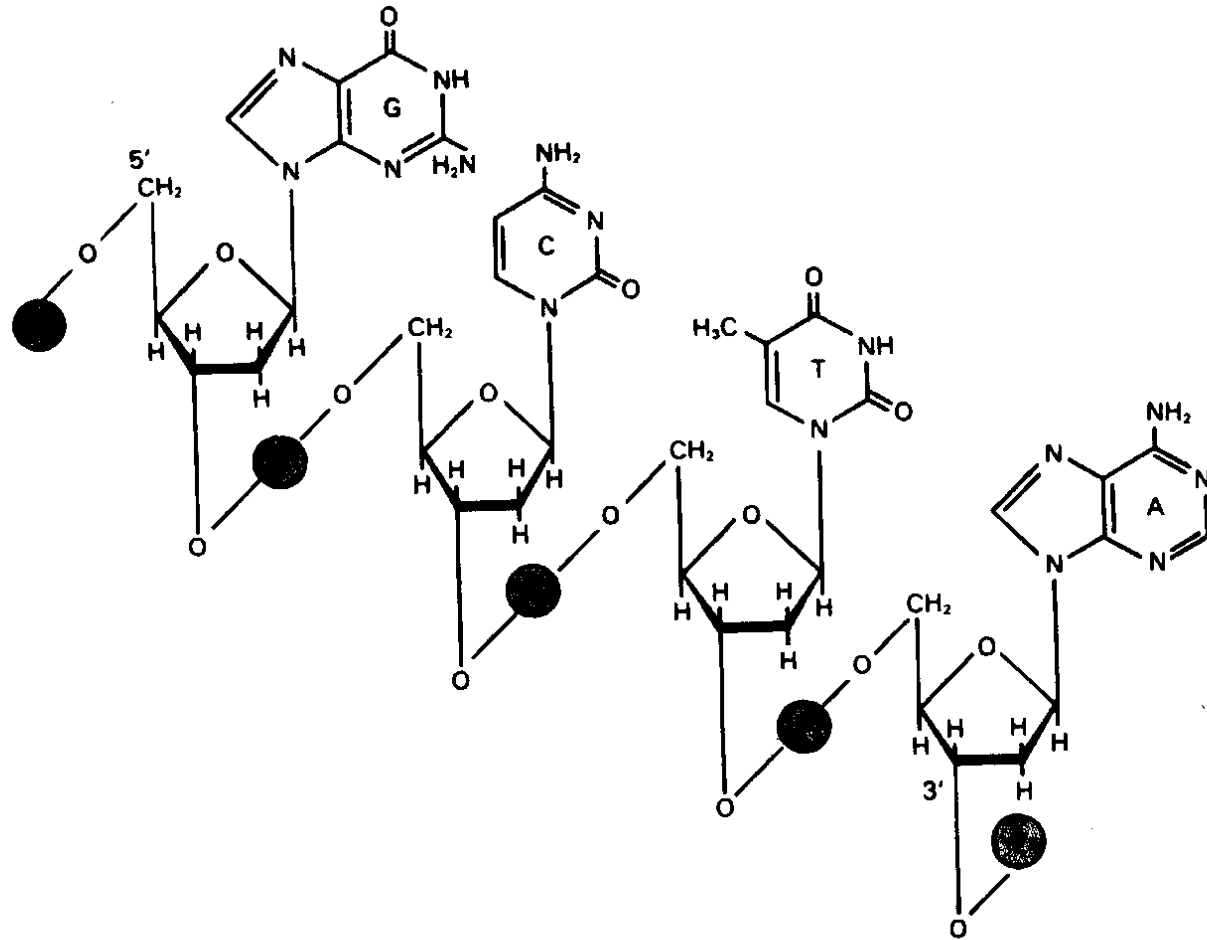


## Watson, Wilkins and Crick model (1962):

DNA is a macromolecule made of two polydeoxynucleotide chains. The two strands are constituted of a great number of nucleotides. Each nucleotide is formed with a phosphoric acid **P** and a desoxyribose sugar **S** on which is attached one of the four bases: **A** (adenine), **T** (Thymine), **C** (Cytosine), **G** (Guanine). These bases are complementary by two, through to three hydrogen bonds in the **C-G** base pair and two in the **T-A** base pair.



# DNA STRUCTURE



**Рис. 37.1.** Фрагмент структуры молекулы ДНК, в которой пуриновые и пиримидиновые основания аденин (А), тимин (Т), цитозин (С) и гуанин (G) удерживаются вместе фосфодиэфирным остовом, соединяющим 2'-деоксирибозильные остатки, связанные N-гликозидной связью с соответствующими нуклеиновыми основаниями. Обратите внимание: фосфодиэфирный остов единичной цепи ДНК обладает «полярностью» (т. е. в нем можно выделить определенное направление, например 5' → 3').

## PRINCIPLE OF DNA CHIP

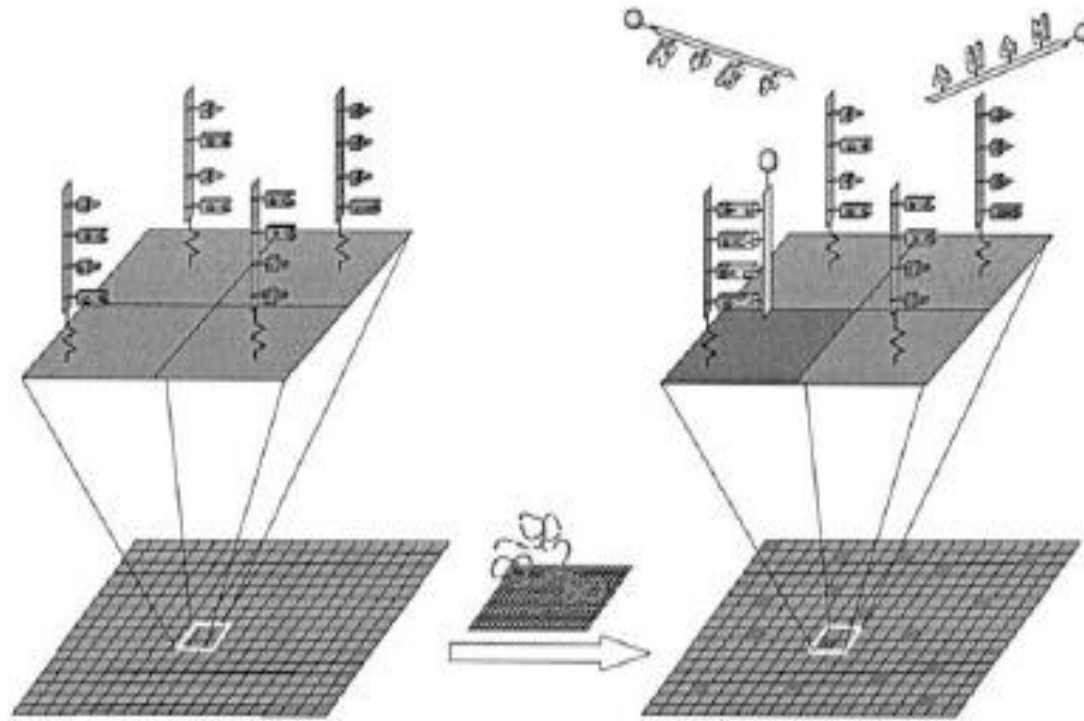
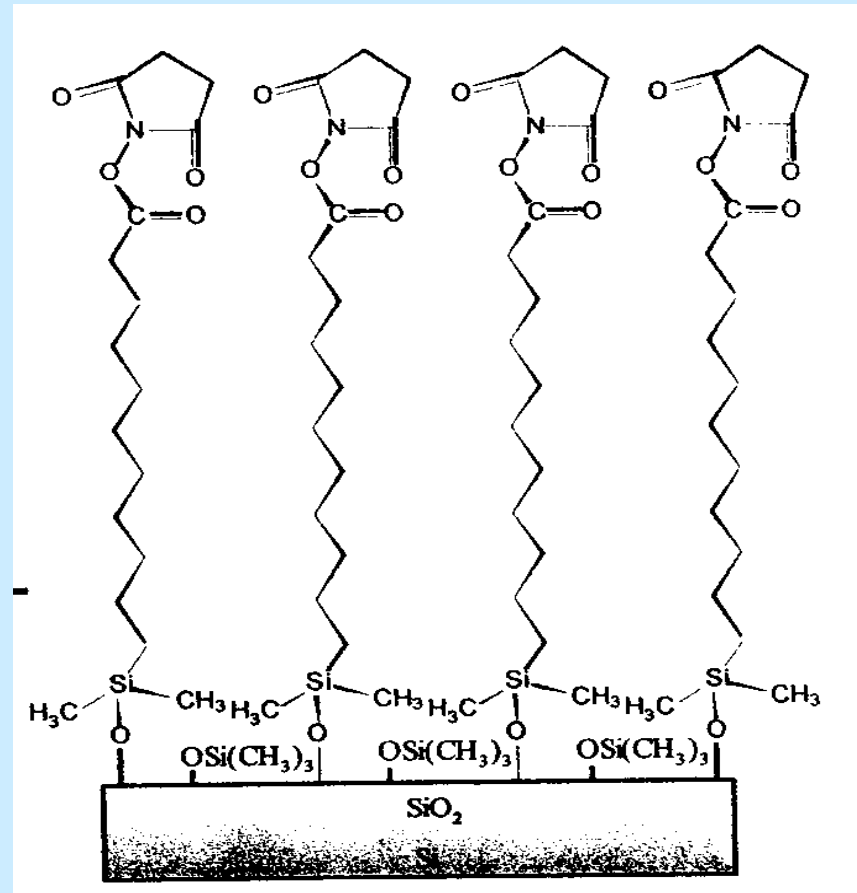


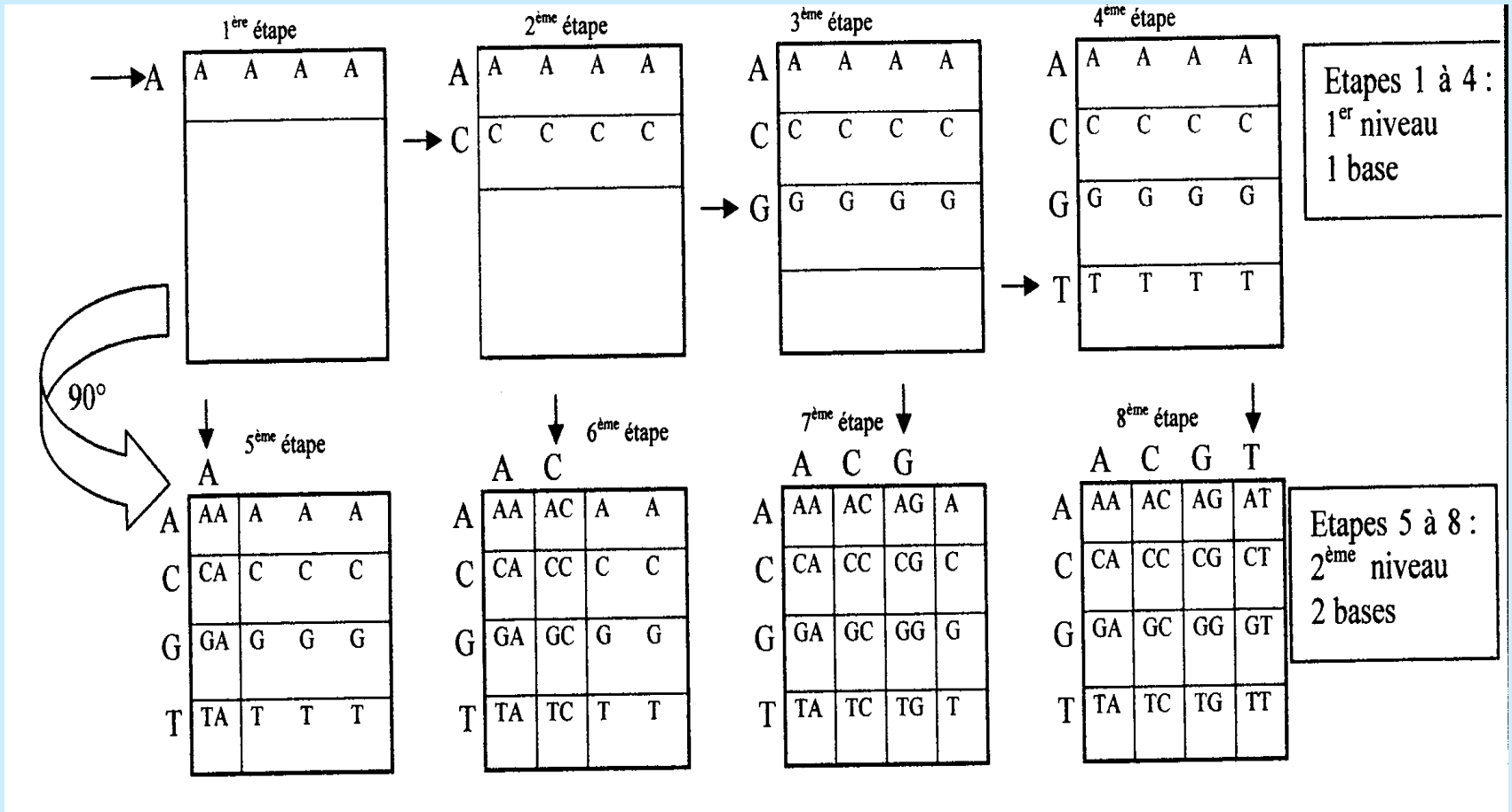
Fig. 2. Principle of DNA chips: on solid support, patchwork of active areas are arrayed. Each area contains one type of oligonucleotides (single DNA strands) as probes. DNA chips are dipped into a solution containing targets to be detected (various single DNA strands carrying markers). When targets are complementary with probes immobilised on surface, hybridisation process occurs. By scanning the surface, thanks to the markers, hybridised units can be located.

## DNA chip on Si substrate

- 1) Si surface treatment (chemical etching and cleaning)
- 2) Thermal oxidation
- 3) Silanisation
- 4) Functionalisation (grafting)
- 5) Oligonucleotide deposition
- 6) DNA hybridisation

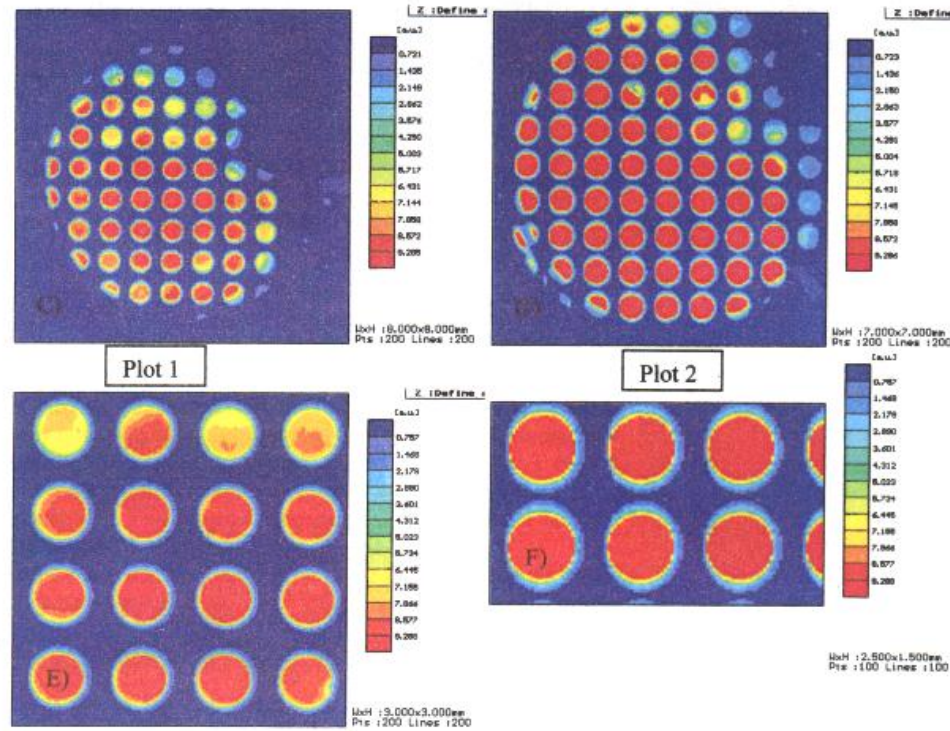
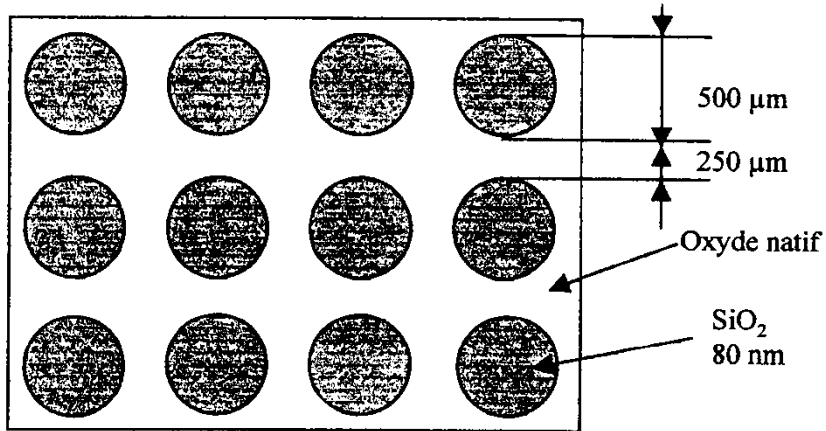


# DNA MACHINE SYNTHESIS

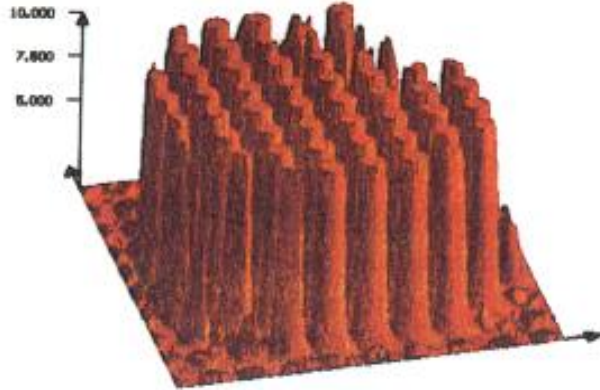


# Fluorescence Mapping of DNA Sensor

## Microstructuration du substrat



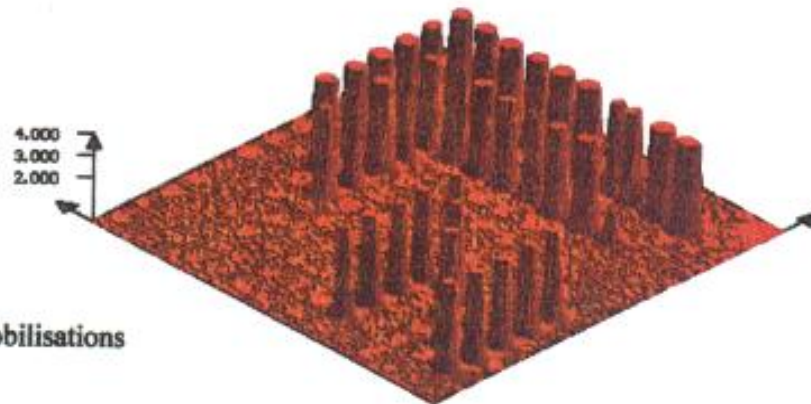
# 3D fluorescence mapping



Plot 1 ( L185 )

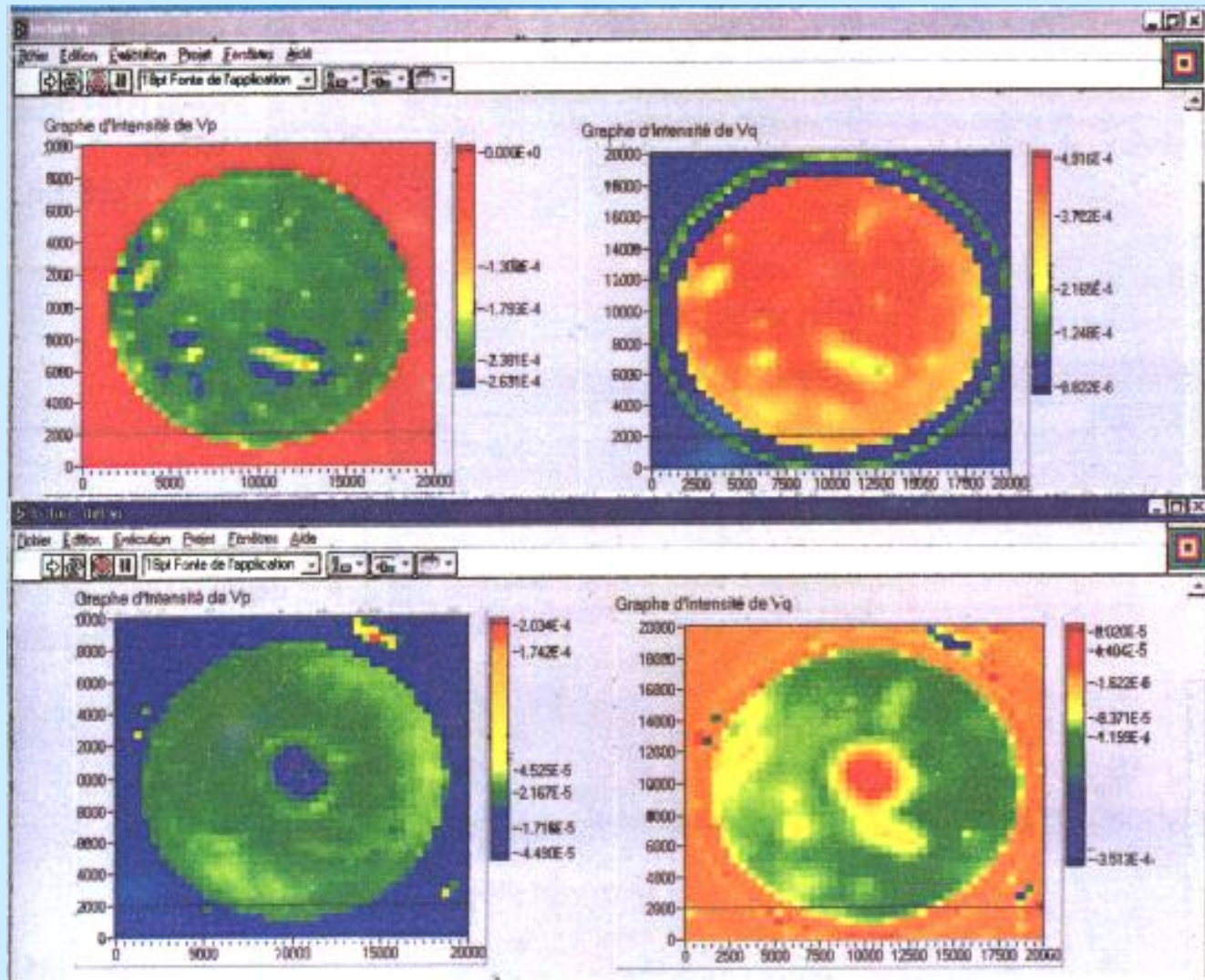


Plot 2 ( U226 )



Zone d'immobilisations

# Impedance mapping



Type n + piranha  
+ dépôt U185

**Cartographie différentielle :**  
(Type n + piranha + dépôt U185 + hybridation I185)-  
(Type n + piranha + dépôt U185 + hybridation I185 + dilution du milieu de mesures par dix)

Figure 2.1.3-2 Cartographies d'impédances optoélectrochimiques



# Microcavities and Bragg reflectors for DNA sensors

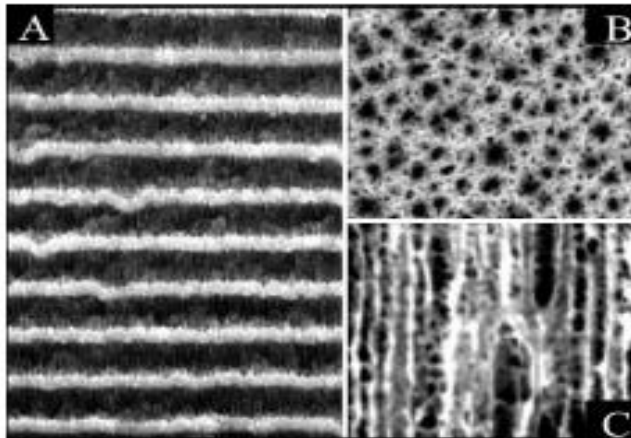


Fig. 1. [A] Cross-sectional SEM micrograph of a 10 period p+ oxidized porous silicon multilayer stack with overall thickness of 2.4  $\mu\text{m}$ . The thickness of the low porosity layers (43%) is 80 nm and that of the high porosity layers (62%) is 160 nm. [B] Plan view SEM of the top porous silicon layer of a multilayer stack with pore diameter of  $\sim 20$  nm. [C] Cross-sectional SEM micrograph of the active layer in a microcavity resonator with porosity of 68% and pore diameter of 60–75 nm.

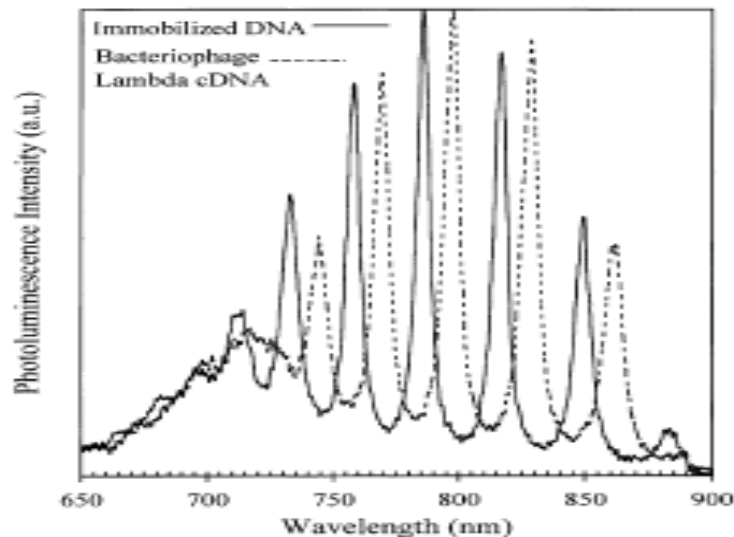


Fig. 7. Recognition and binding of bacteriophage lambda DNA to a 30 nucleotide complementary DNA sequence immobilized on the porous silicon sensor is confirmed by a 12-nm red-shift in the photoluminescence spectrum. The concentration of the sensing bacteriophage lambda DNA is 194.2 fM.

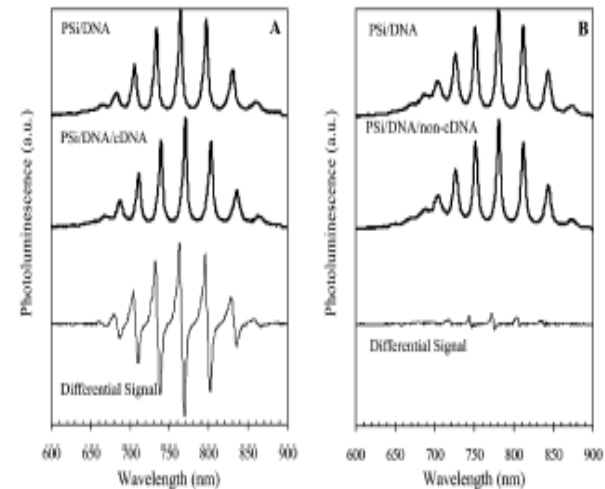


Fig. 6. 50  $\mu\text{M}$  of DNA (TAG CTA TGG AAT TCC TCG TAG GCA) is attached to the porous silicon microcavity structure, shown as the top spectrum in both plots. 1  $\mu\text{M}$  of complementary DNA is exposed to the DNA attached porous silicon and a 7-nm red-shift is observed after binding (middle spectrum of Fig. A). A large differential signal is obtained before and after binding. When a non-complementary strand of DNA is exposed to the porous silicon sensor (middle spectrum of Fig. B), no shifting of the luminescence peaks is observed and the differential signal is negligible.

S. Chan et al. / Materials Science and Engineering C 15 (2001) 277–282

# PS optical sensor

H.-K. Min et al. / *Sensors and Actuators B* 67 (2000) 199–202

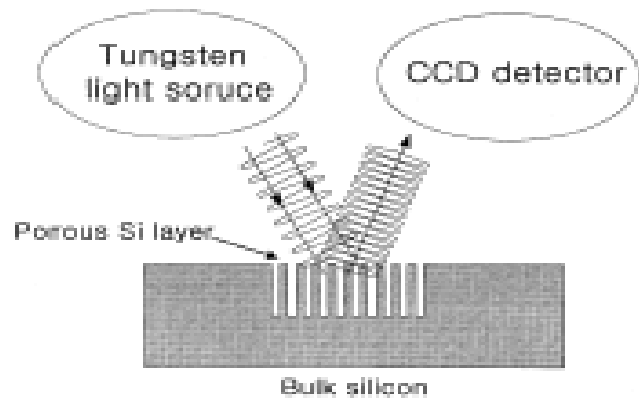


Fig. 2. Schematic of generation of Fabry-Perot interference fringes.

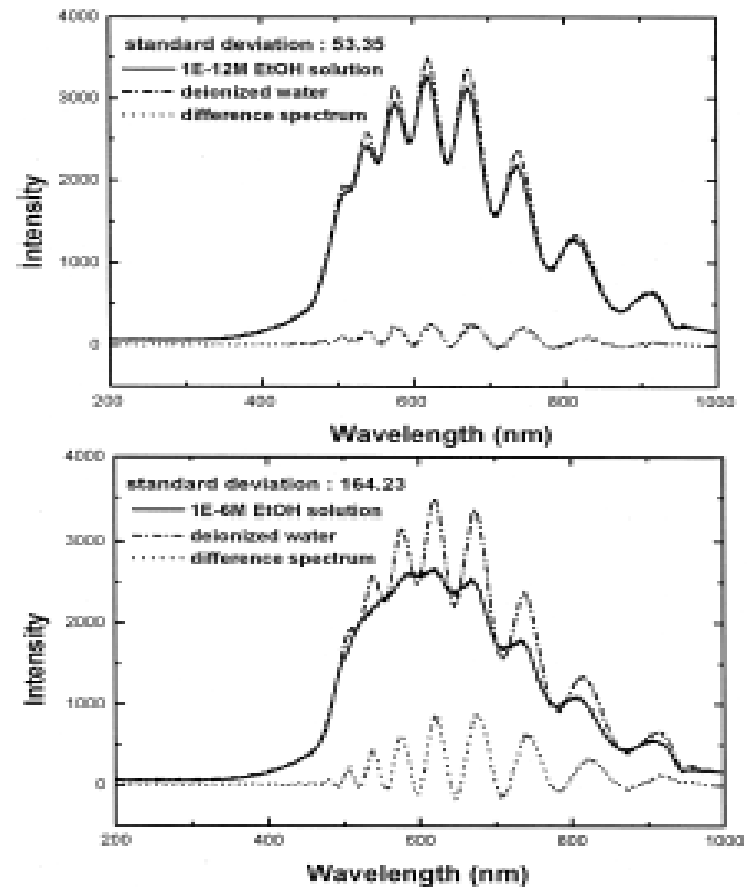


Fig. 4. Fabry-Perot fringe patterns and difference spectra at  $1 \times 10^{-6}$  and  $1 \times 10^{-12}$  M ethanol concentrations.