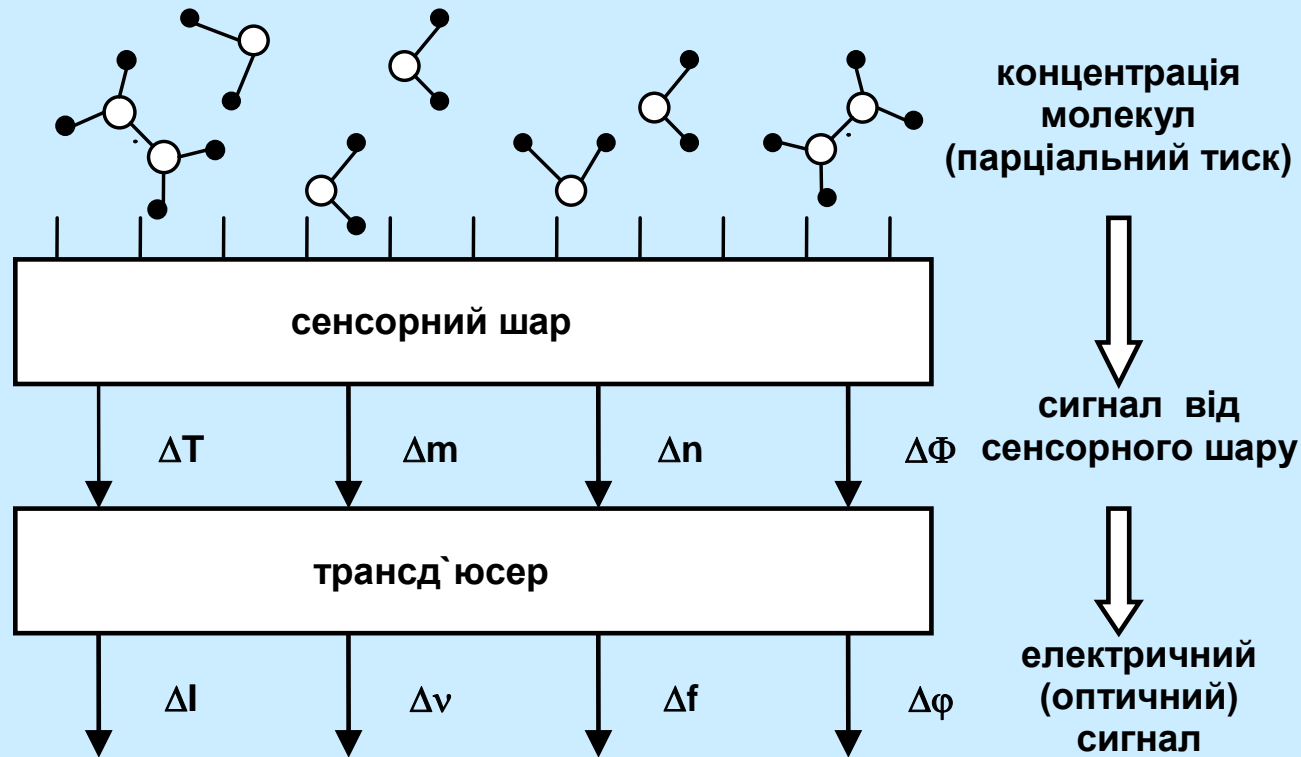




Напівпровідникові біосенсори

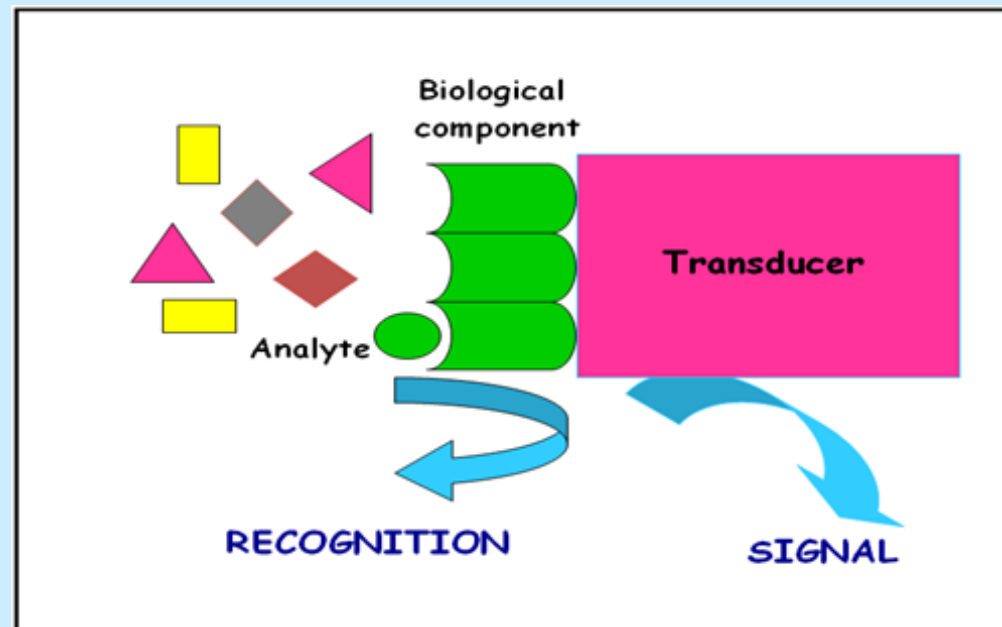
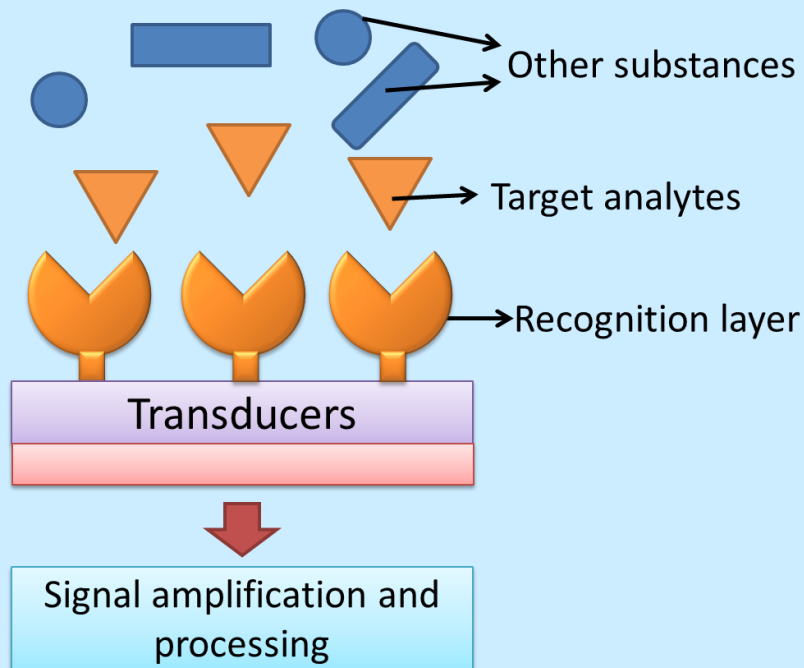
проф. В.А.Скришевський

ЩО ТАКЕ БІОСЕНСОР?



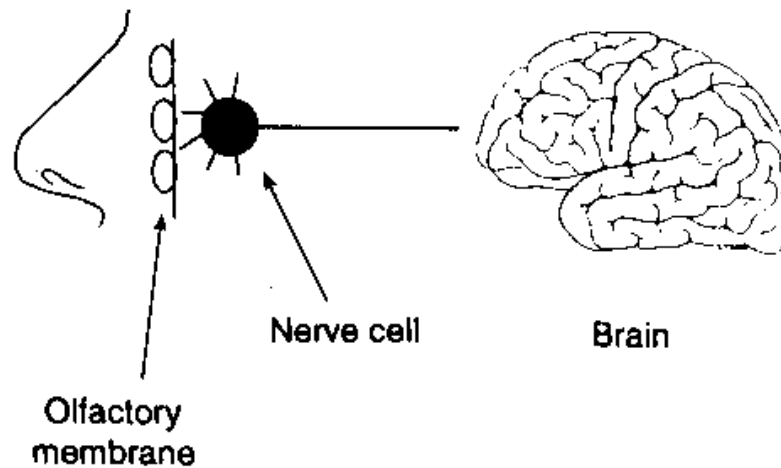
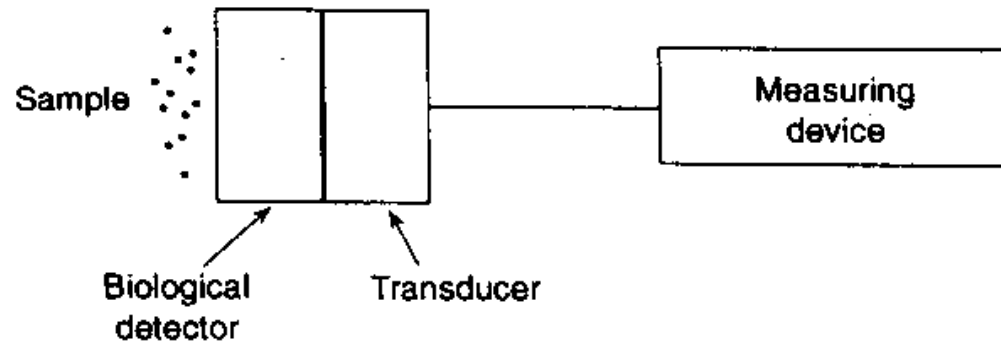
Схема, яка пояснює принцип дії хімічного сенсора

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-розпізнавальною 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 **метаболічному біосенсорі** біоактивний матеріал перетворює аналіт та інші ко-реактанти в молекули продуктів. Трансдюсер перетворює результат цієї реакції у вихідний сигнал

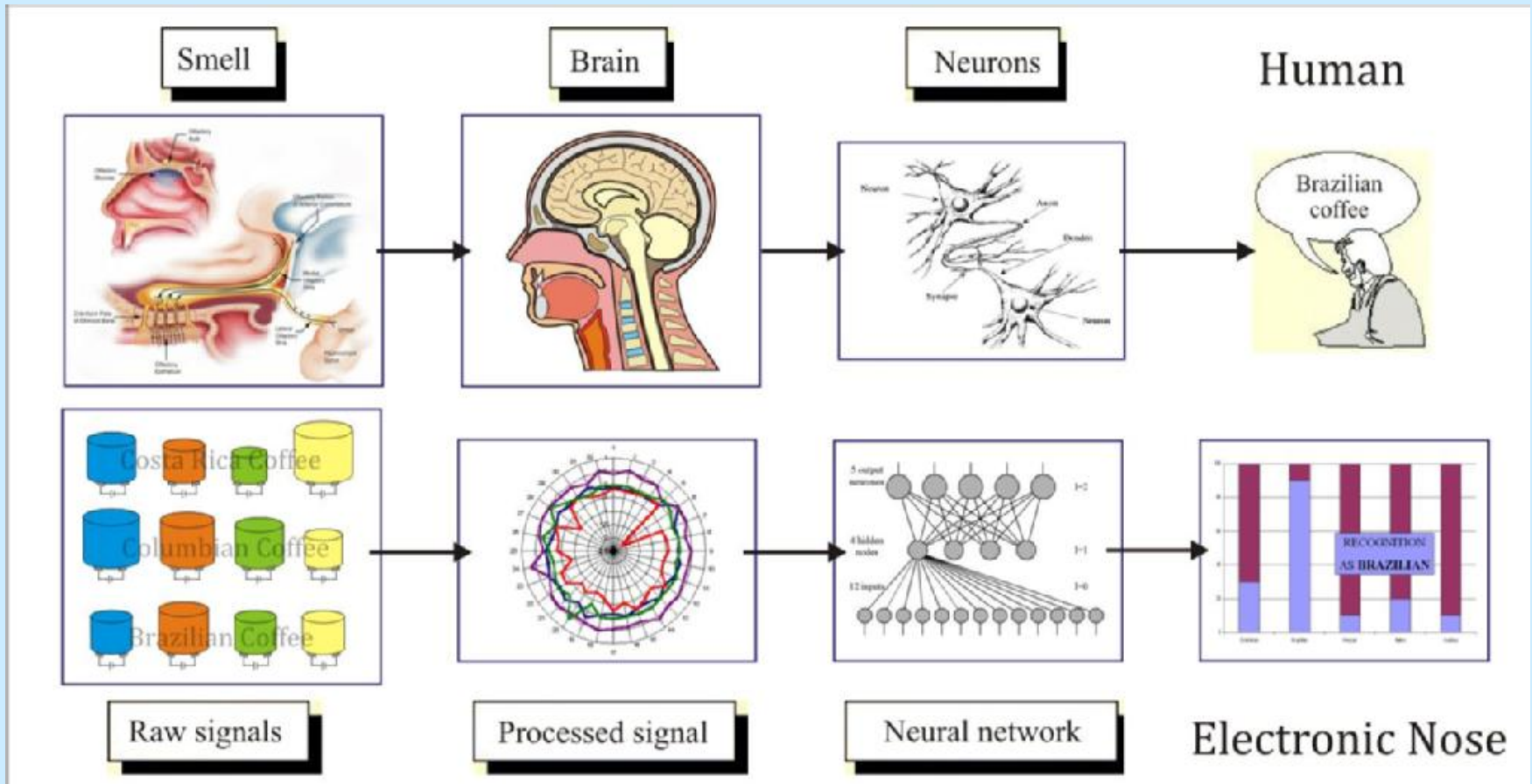
Ніс як біосенсор



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

запах → розпізнавання → електричний сигнал → інтерпретація

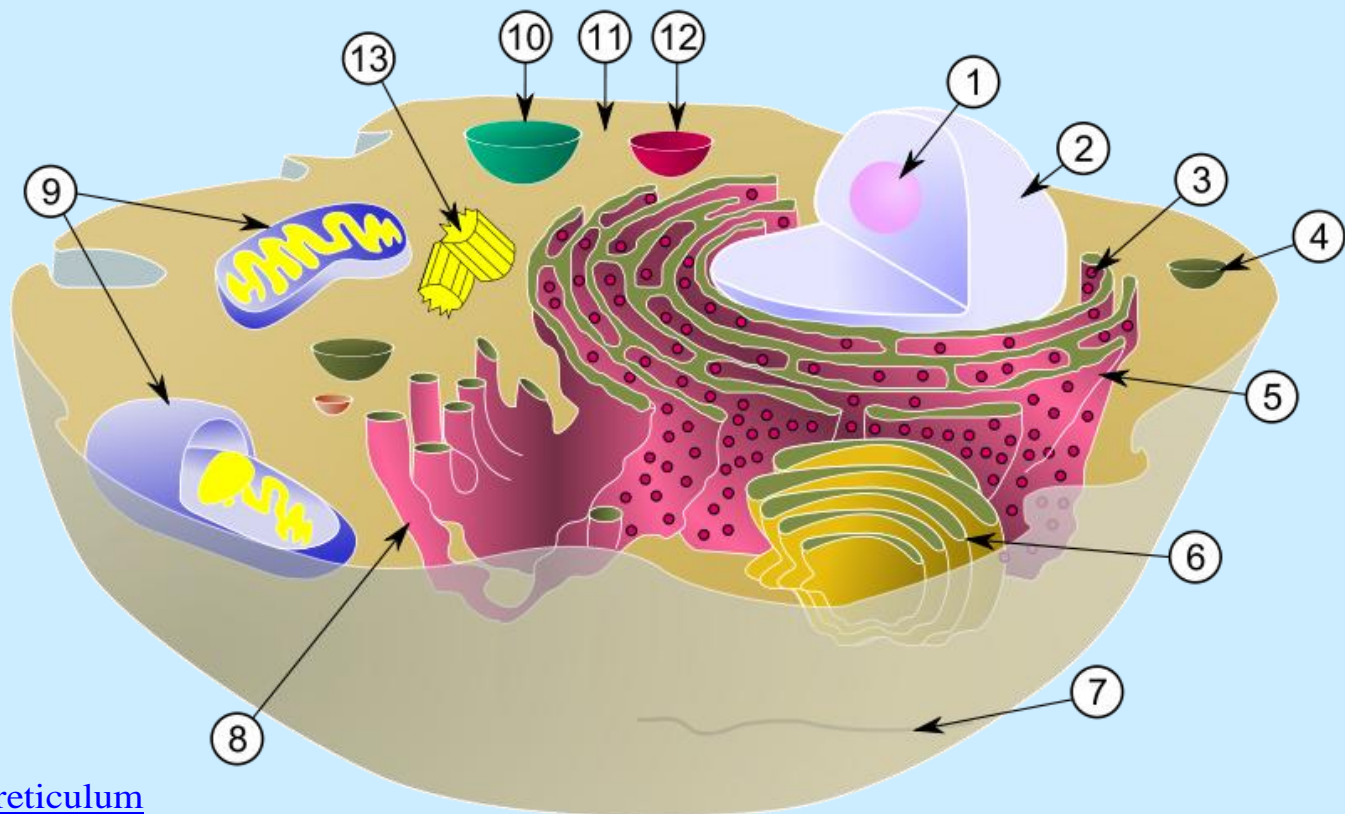
Electronic nose concept



Chain of recognition of odor: sniffing of air samples with odorant molecules, turbulent airflow patterns of VOC, a thin mucus layer coating the **olfactory epithelium**, **nerve cell**, **brain**

E-nose: **response of an array of gas sensors to identify an odor (sensor) + pattern recognition technique**

Тваринна клітина - природний біосенсор

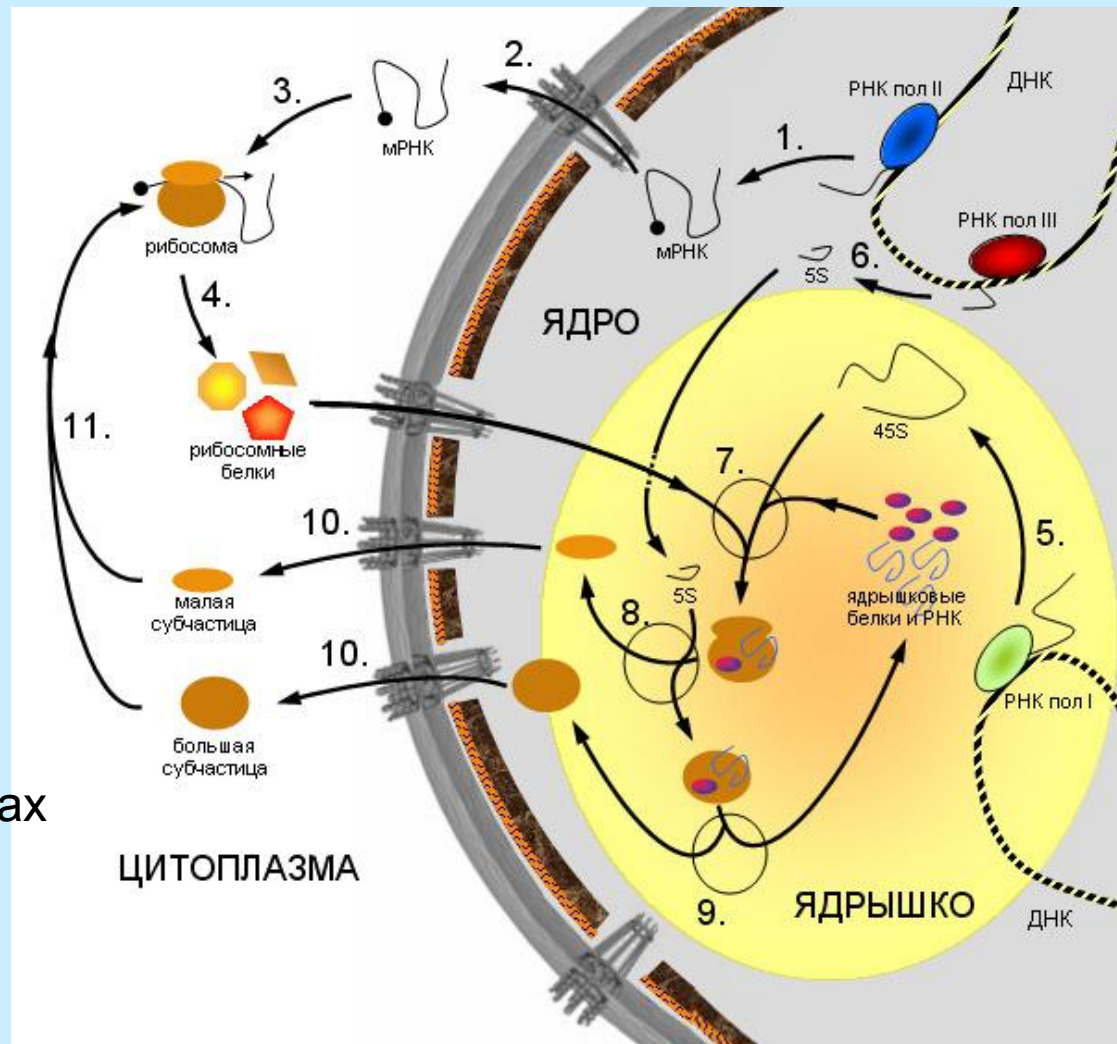


1. [Ядрышко](#)
2. [Ядро](#)
3. [Рибосома](#)
4. [Везикула](#)
5. [Rough endoplasmic reticulum](#)
6. [Аппарат Гольджи](#)
7. [Клеточная стенка](#)
8. [Smooth endoplasmic reticulum](#)
9. [Митохондрия](#)
10. [Вакуоль](#)
11. [Цитоплазма](#)
12. [Лизосома](#)
13. [Центросома \(Центриоль\)](#)

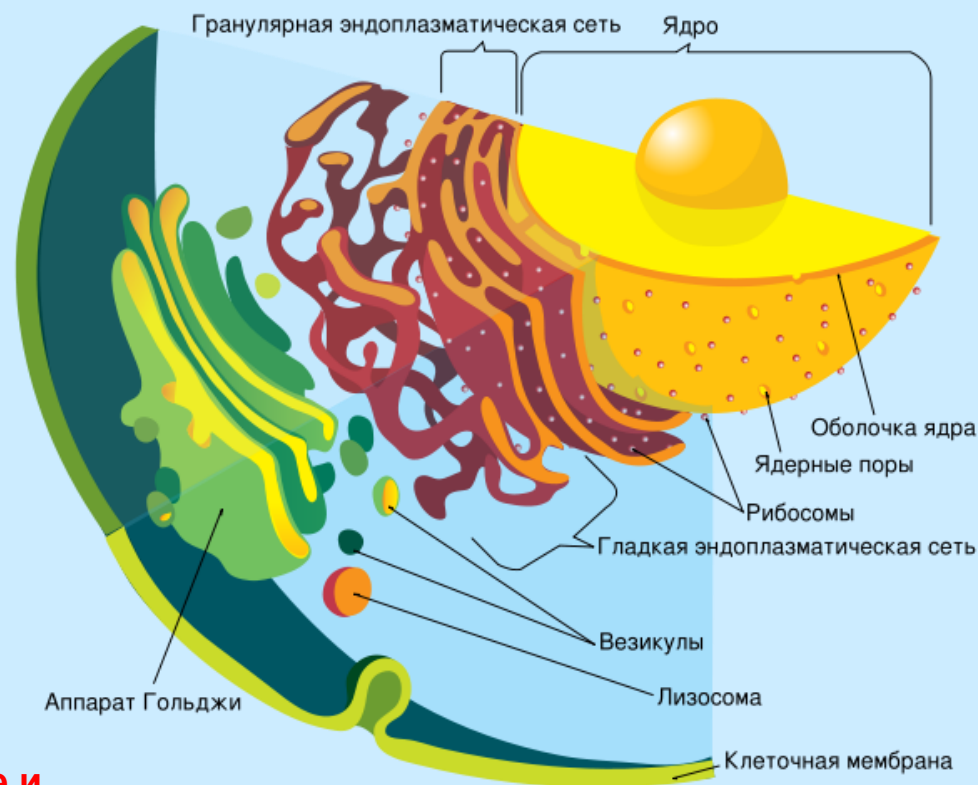
Ядро (лат. nucleus), органелла эукариотической клетки, содержащая генетическую информацию в форме молекул ДНК. В ядре происходит репликация — удвоение молекул ДНК, а также транскрипция — синтез молекул РНК на матрице ДНК. В ядре же синтезированные молекулы РНК подвергаются ряду модификаций, после чего выходят в цитоплазму. Сборка рибосом также происходит в ядре, в специальных образованиях, называемых ядрышками. Размер - микроны

Рибосома — важнейший органоид живой клетки сферической или слегка овальной формы, диаметром 100-200 ангстрем, состоящий из большой и малой субъединиц. Рибосомы служат для биосинтеза белка из аминокислот по заданной матрице на основе генетической информации, предоставляемой матричной РНК, или мРНК. Этот процесс называется трансляцией.

Схема синтеза рибосом в клетках



Аппарат Гольджи (комплекс Гольджи) — мембранная структура эукариотической клетки, в основном предназначенная для выведения веществ, синтезированных в эндоплазматическом ретикулуме. В цистернах Аппарата Гольджи созревают белки предназначенные для секреции, трансмембранные белки плазматической мембраны, белки лизосом и т.д. Созревающие белки последовательно перемещаются по цистернам органеллы, в которых происходит их окончательное сворачивание, а также модификации — гликозилирование и фосфорилирование.

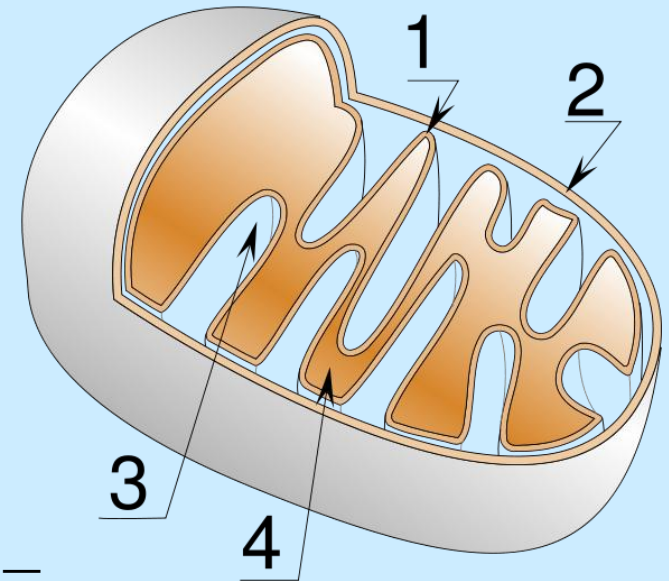


Клеточная стенка — жёсткая оболочка клетки, расположенная снаружи от цитоплазматической мембраны и **выполняющая структурные, защитные и транспортные функции**. Обнаруживается у большинства бактерий, архей, грибов и растений, животные и многие простейшие не имеют клеточной стенки. Толщина — до 10 нм

Митохондрия (от греч. μίτος — нить и χόνδρος — зёрнышко, крупинка) — один из важнейших органовидов живой клетки эукариот, являющийся её «энергетической фабрикой» и содержащий, в частности, дыхательные и другие окислительно-восстановительные ферменты. Является местом производства АТФ (в процессе окислительного фосфорилирования), обеспечивает энергией в виде АТФ другие клеточные органоиды, клетку в целом.

Зма — **внутренняя среда живой клетки**, ограниченная плазматической мембраной. Включает в себя гиалоплазму — основное прозрачное вещество цитоплазмы, находящиеся в ней обязательные клеточные компоненты — органеллы, а также различные непостоянные структуры — включения. В состав цитоплазмы входят все виды органических и неорганических веществ. В ней присутствуют также нерастворимые отходы обменных процессов и запасные питательные вещества.

Лизосома — клеточный органовид содержащий ряд ферментов — гидролаз, способных расщеплять белки, липиды и нуклеиновые кислоты, катепсины (тканевые протеазы), рибонуклеазы, кислую рибонуклеазу, кислую фосфатазу, фосфолипазу, функциями которого являются переваривание захваченных клеткой частиц, автофагия (уничтожение ненужных клетке структур, например, во время замены старых органоидов новыми) и автолиз.



- Структура митохондрии:
- 1) Внутренняя мембрана
 - 2) Внешняя мембрана
 - 3) Кристы
 - 4) Матрикс

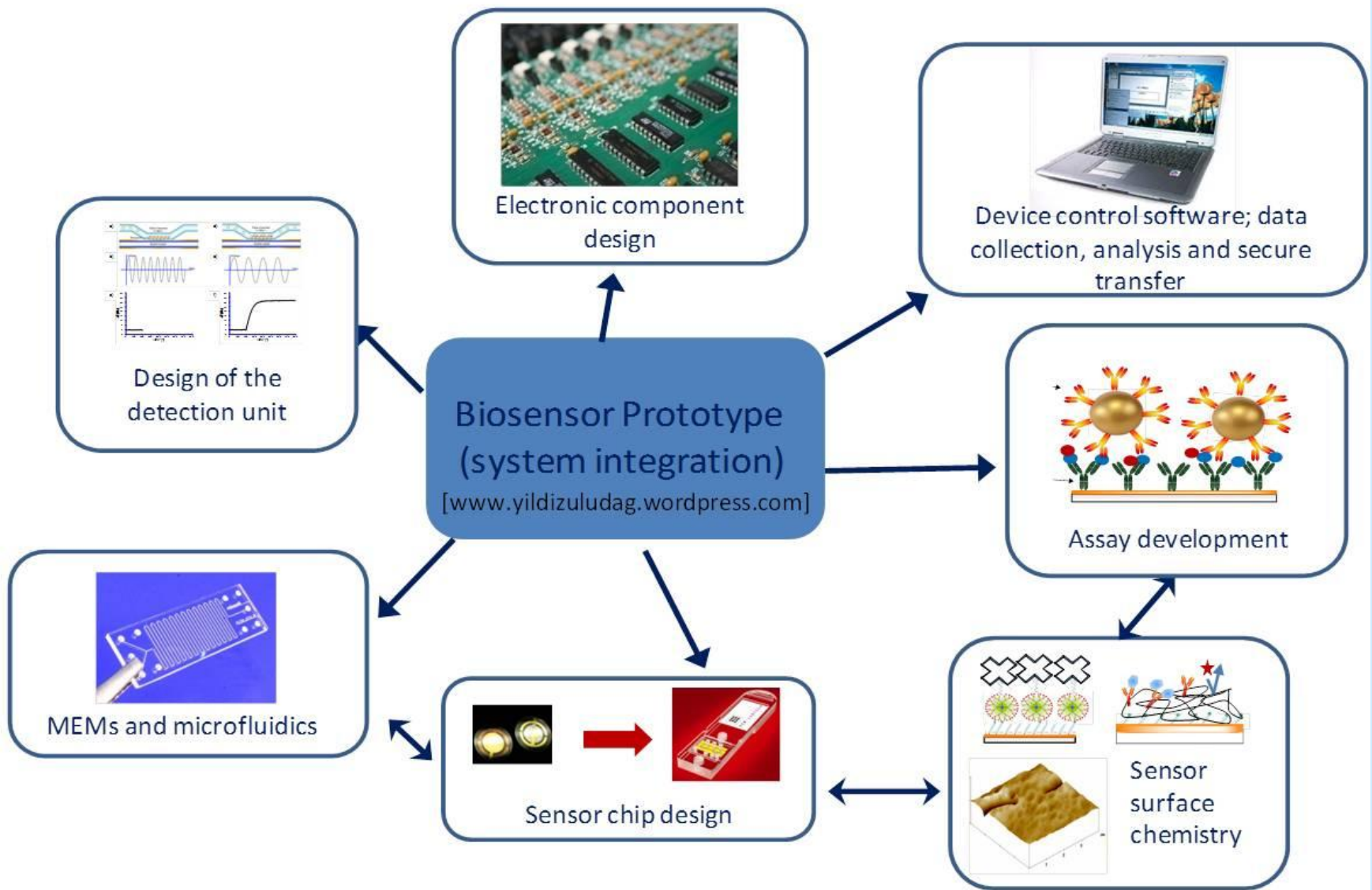
БІОМАТЕРІАЛИ ТА ВЛАСТИВОСТІ БІОСЕНСОРІВ

Таблиця 1.1 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

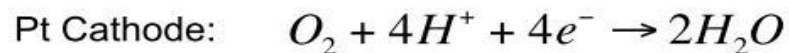
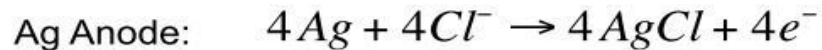
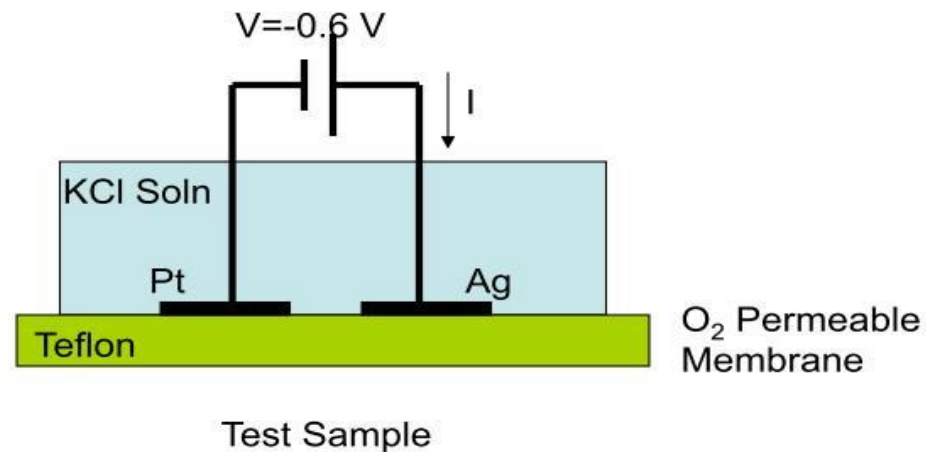
Таблиця 1.2 Компоненти біосенсорів

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 ФЛ
рецептори	калориметричний	Термістори та термопари
антітіла нуклеїнові кислоти	акустичний	Поверхневі та об'ємні акустичні хвилі, мікробаланс



ПЕРШІ БІОСЕНСОРИ

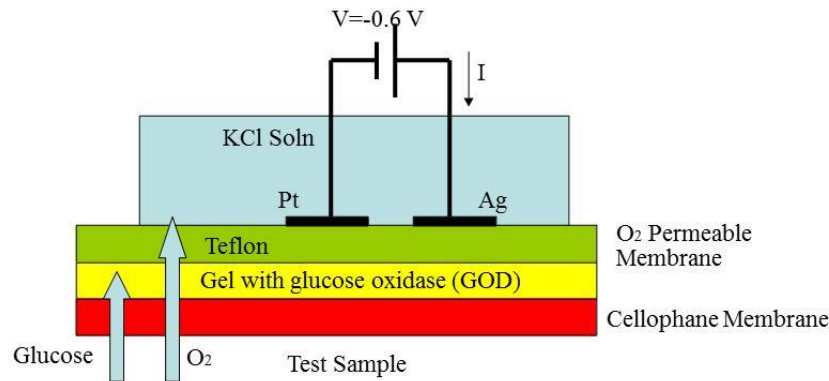
Clark O₂ Sensor



- O₂ in test sample diffuses through membrane into KCl electrolyte
- O₂ is REDUCED at the Pt cathode
- 4e⁻ produced by each reduced O₂ results in current flow proportional to [O₂]

Схема процесів в біосенсорі Кларка для глюкози (1962)

Clark Glucose Sensor - Generation 1



Test sample contains Glucose and O_2

$[O_2] = \text{CONSTANT}$

$[\text{Glucose}] = \text{VARIABLE}$

In presence of ENZYME (GOD)



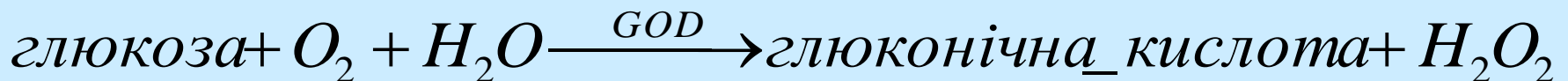
ECE/BioE 416

Lecture 10

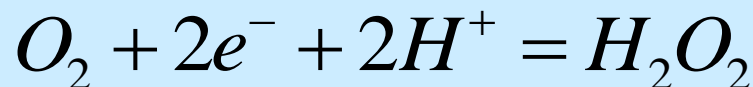
8

Вимірюється струм пропорційний концентрації кисню

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



На Pt електроді:



Основні параметри сенсора (Yellow Spring Instrument, 1974):

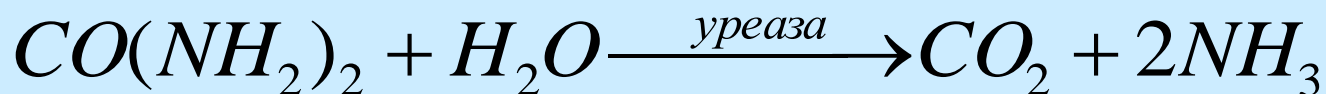
Область концентрацій глюкози- <1-30 мМ.

Час відповіді- 1-1,5 хв.

Час відновлювання- 0,5 хв.

Час життя сенсора- декілька місяців

Біосенсор на сечовину (основна компонента уріну) 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 імобілізації, що дозволяє проводити до 20 аналізів за годину).

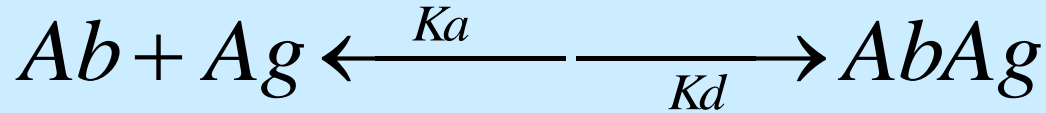
Час життя сенсора- 60 днів.

Для створення біосенсору необхідно створити біомембрану,

в якій відбувається зв'язування аналітичної та біоактивної молекули (**біоспорідненість**) або біоактивний матеріал перетворює аналіт та інші ко-реактанти в молекули продуктів (**біометаболізм**). Трансдюсер перетворює результат цієї реакції у вихідний сигнал

БІОРОЗПІЗНАВАННЯ. РІВНЯННЯ МІХАЕЛІСА-МЕНТОНА

Для біо-розпізнавальних процесів за методом біо-спорідненості:



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

Якщо фіксується концентрація антитіл

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

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

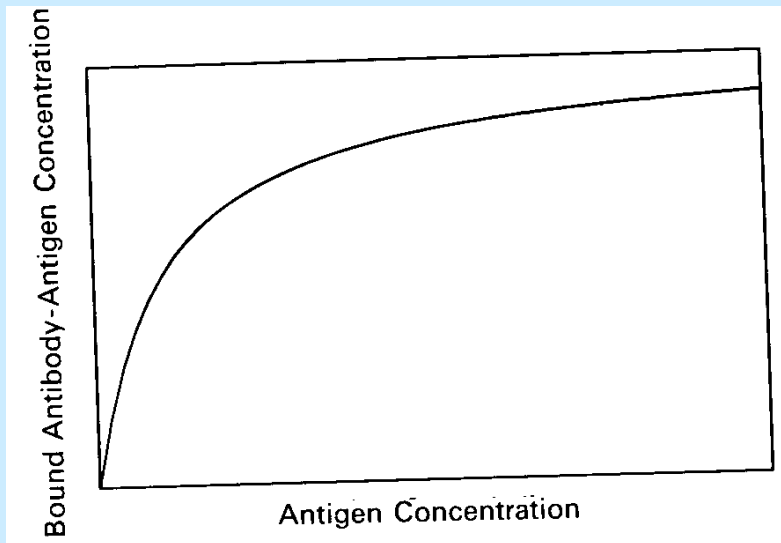
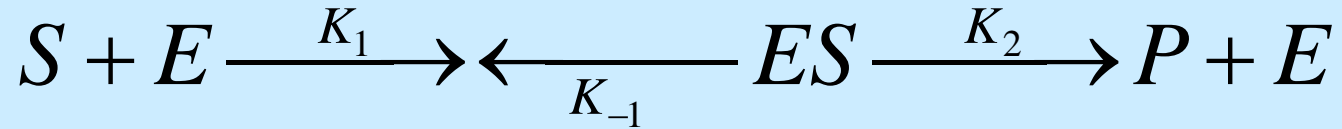


Рис.1.4 Рівноважна концентрація зв'язаного комплексу антитіло - антиген як функція концентрації антигену в системі з фіксованою концентрацією антитіла в мембрані

Система ензим – субстрат для біо- метаболического біосенсору



$$[E]_{\text{заг}} = [E]_{\text{св}} + [ES]_{\text{св}} \qquad V = \frac{\partial [P]}{\partial t} = K_2 [ES]$$

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

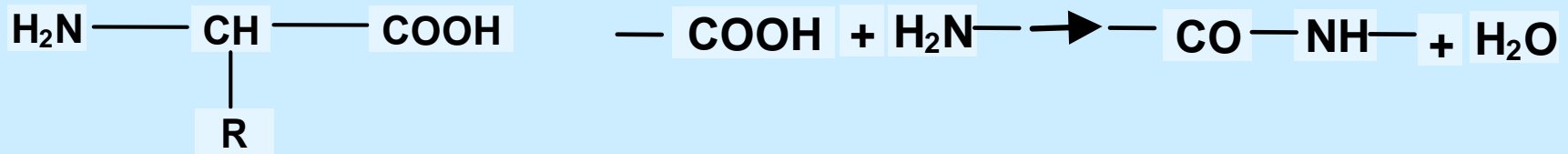
$$V = \frac{K_2 [E]_{\text{заг}} [S]}{([S] + K_M)}$$

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

В ензимних біосенсорах ензим іммобілізується в мембрані на поверхні трансдюсера

ІМОБІЛІЗАЦІЯ БІОЕЛЕМЕНТІВ

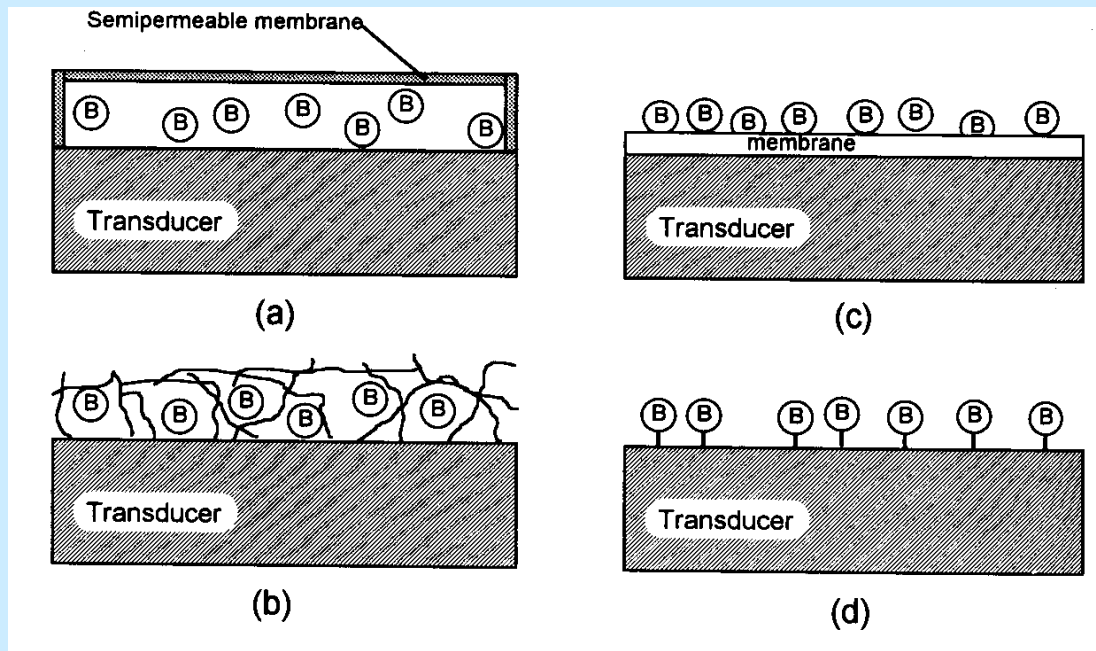
Створення біомембрани



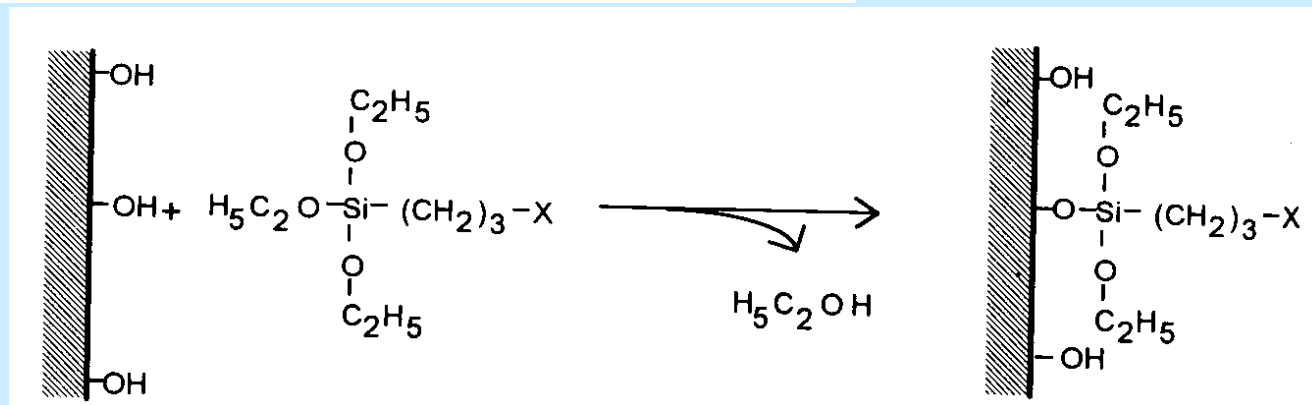
Загальна схема протеїну для всіх 20 природніх протеїнових одиниць, які відрізняються тільки **функціональною групою R** (а) та утворення поліпептидного ланцюга за рахунок взаємодії **аміногрупи** та **карбоксильної** групи (б)

Основні вимоги до імобілізації:


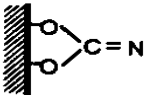

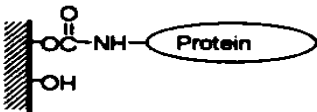

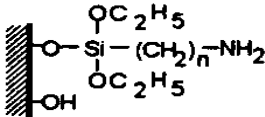

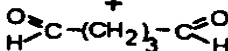
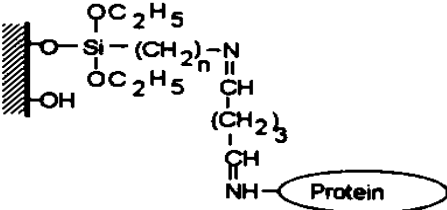

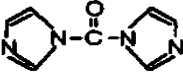
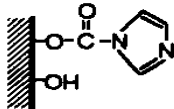

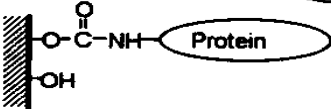

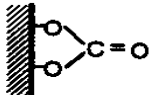

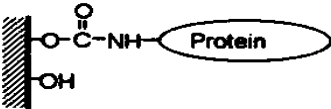
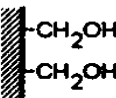
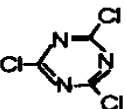
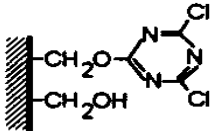

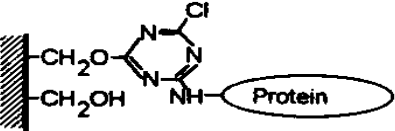

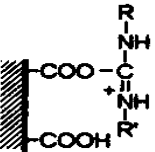

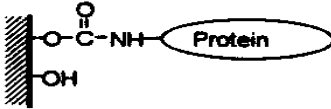



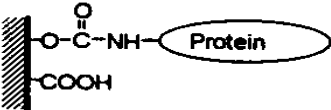
- сумісність біоактивного матеріалу з трансдьюсером і утримання його протягом часу роботи біосенсору;
- можливість контакту з розчином аналіту;
- можливість дифузії будь-якого продукту від імобілізованого шару;
- відсутність ефекту денатурації біоактивного матеріалу.



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, органели, клітини, тканин та організми**



Поверхнева обробка поверхні, наприклад, SiO_2 , яка закінчується гідроксилами для ковалентної імобілізації протеїну, використовуючи алкіл етоксисілан. Кінцева група «X» може бути реактивною групою такою як аміно-, ціано- тощо

Поверхня	Поверхнева обробка	Проміжна група на поверхні	Приєднувальна група	Кінцева група на поверхні
	CNBr			
	$(C_2H_5O)_3Si-(CH_2)_n-X$		 + 	
				
	$ClCO_2C_2H_5$			
				
	$R'-N=C=N-R$			
	SO_2Cl_2			

ТРАНСПОРТ МАС В БІОСЕНСОРАХ

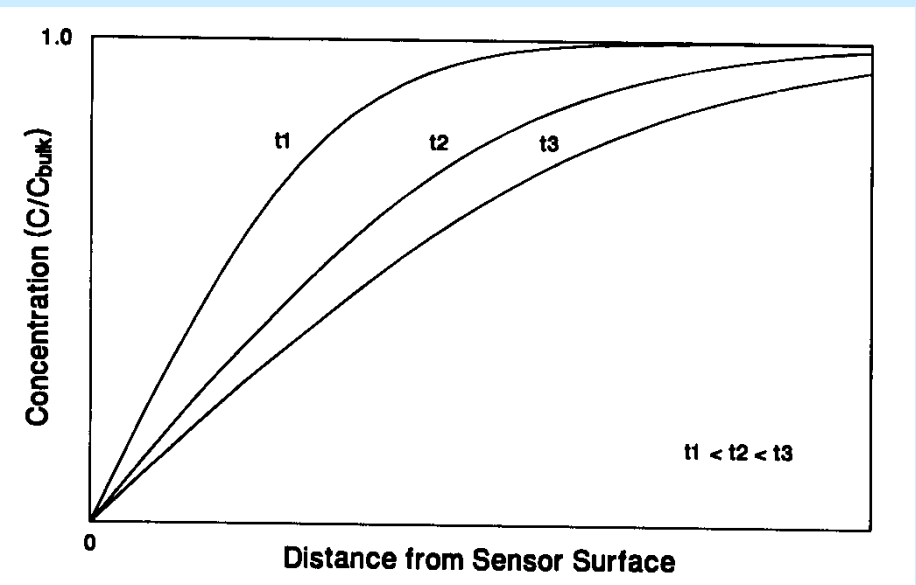
Два рівняння дифузії Фіка

$$j(x,t) = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$$

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}$$

$$C(0,t) = 0, C(\infty,t) = C_{bulk}$$

$$C(x,t) = C_{bulk} \operatorname{erf} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)$$



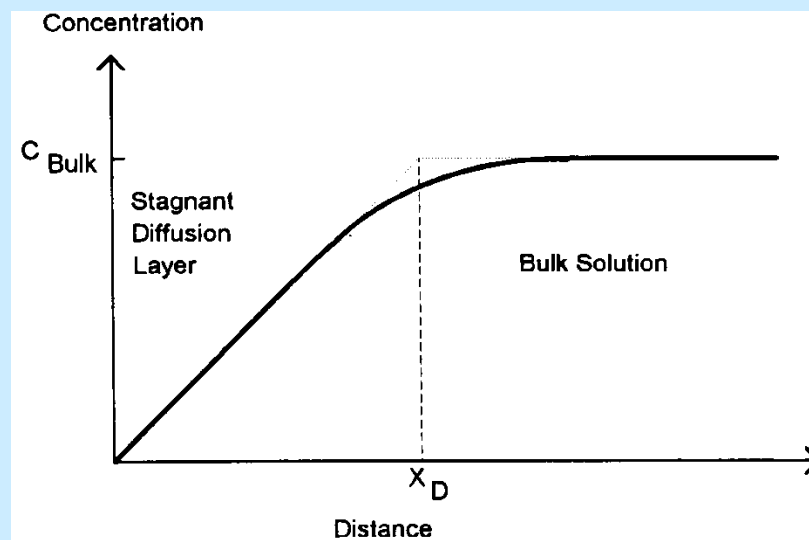
Профіль концентрації при вимірах коли розчин з аналітом примусово не перемішується, реакція розпізнавання є миттєвою та повною і відбувається безпосередньо на поверхні сенсора. З часом концентрація в розчині зменшується як і потік аналіту до поверхні сенсора, сигнал сенсора зменшується

Незручно, оскільки сенсору сигнал змінюється з часом!

У ВИПАДКУ ПЕРЕМІШУВАННЯ РОЗЧИНУ АНАЛІТУ

$$j = k_D (C_{bulk} - C_{surf})$$

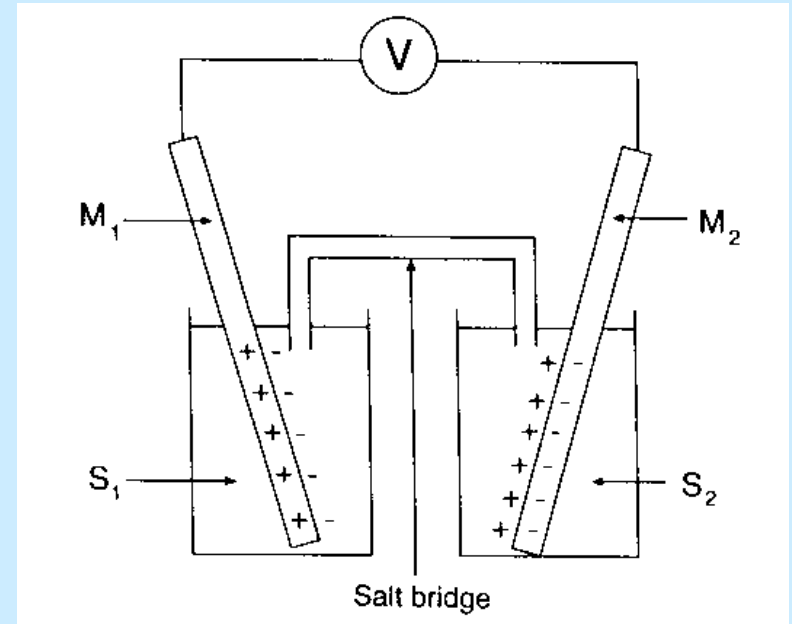
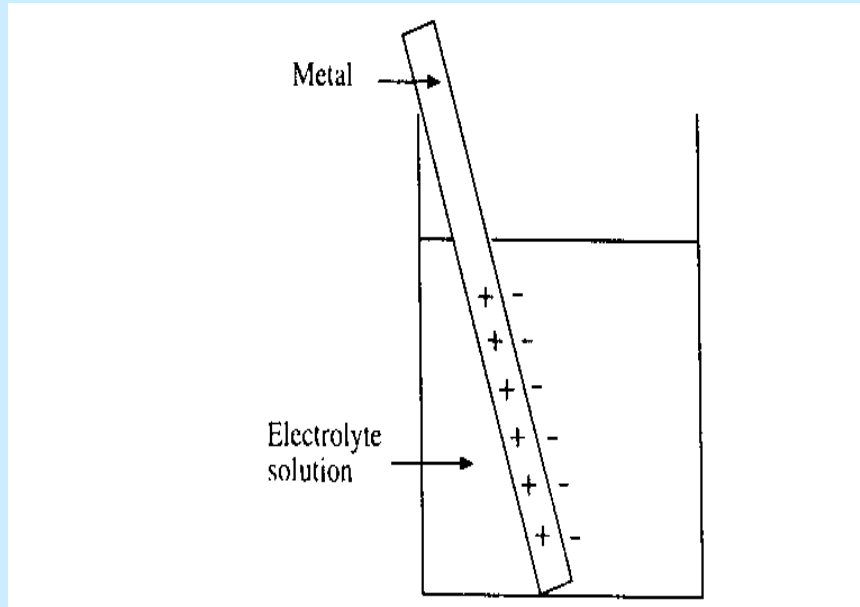
$$k_D = \frac{D}{X_D}$$



Концентраційний профіль у випадку добре перемішаного розчину аналіту

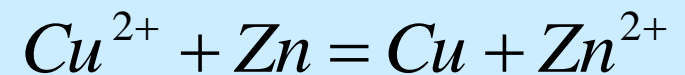
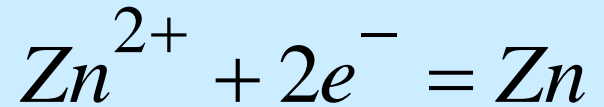
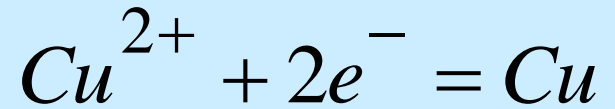
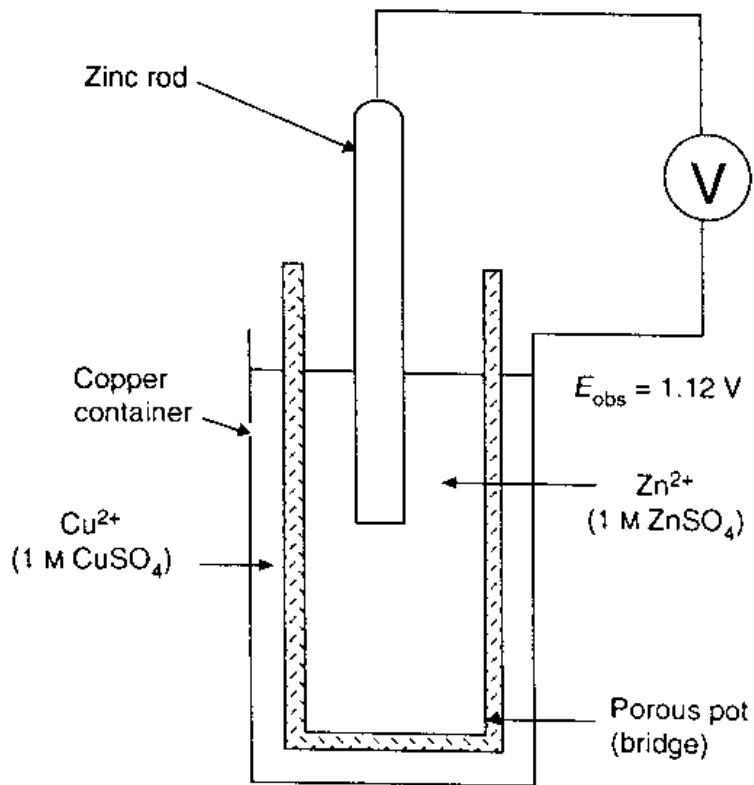
Використовується в реальних сенсорних системах

ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ ТРАНСДУСЕРИ



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

Комірка Данієла

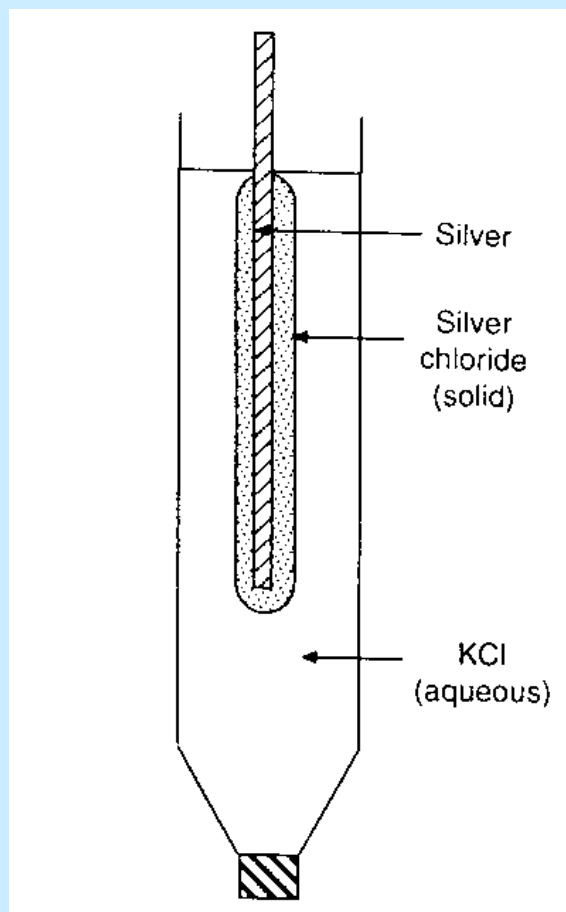


$$E_e = 1.1 \text{ V}$$

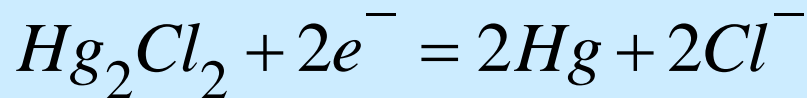
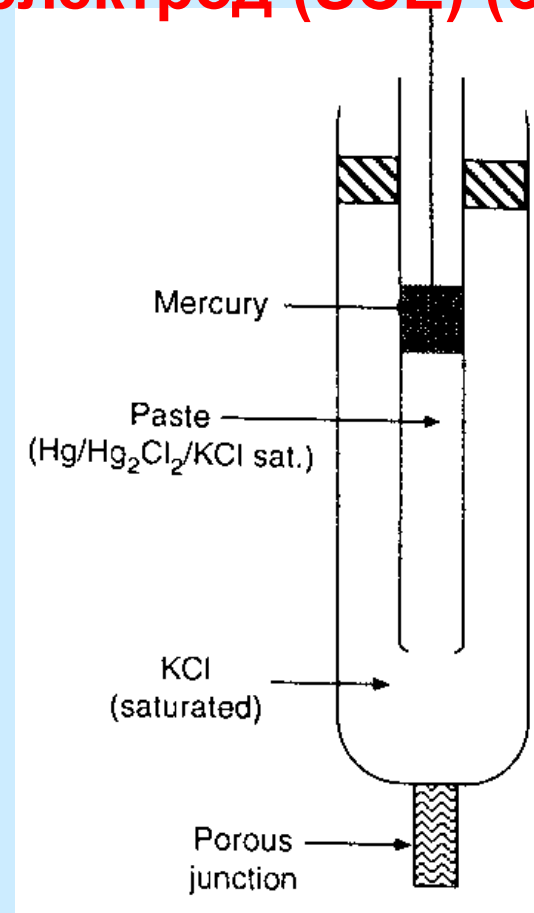
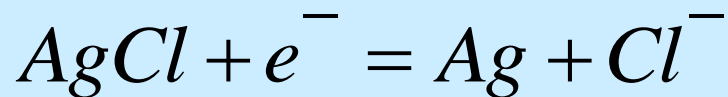
Вільна енергія Гібса

$$\Delta G = -nFE$$

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

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

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

рівняння Хендерсона-Хасельбаха

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

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



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

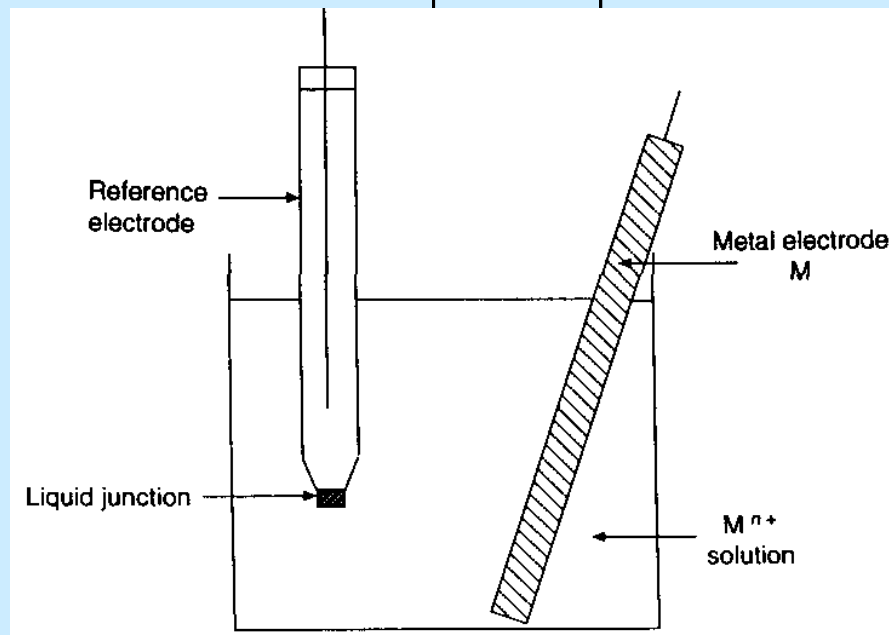
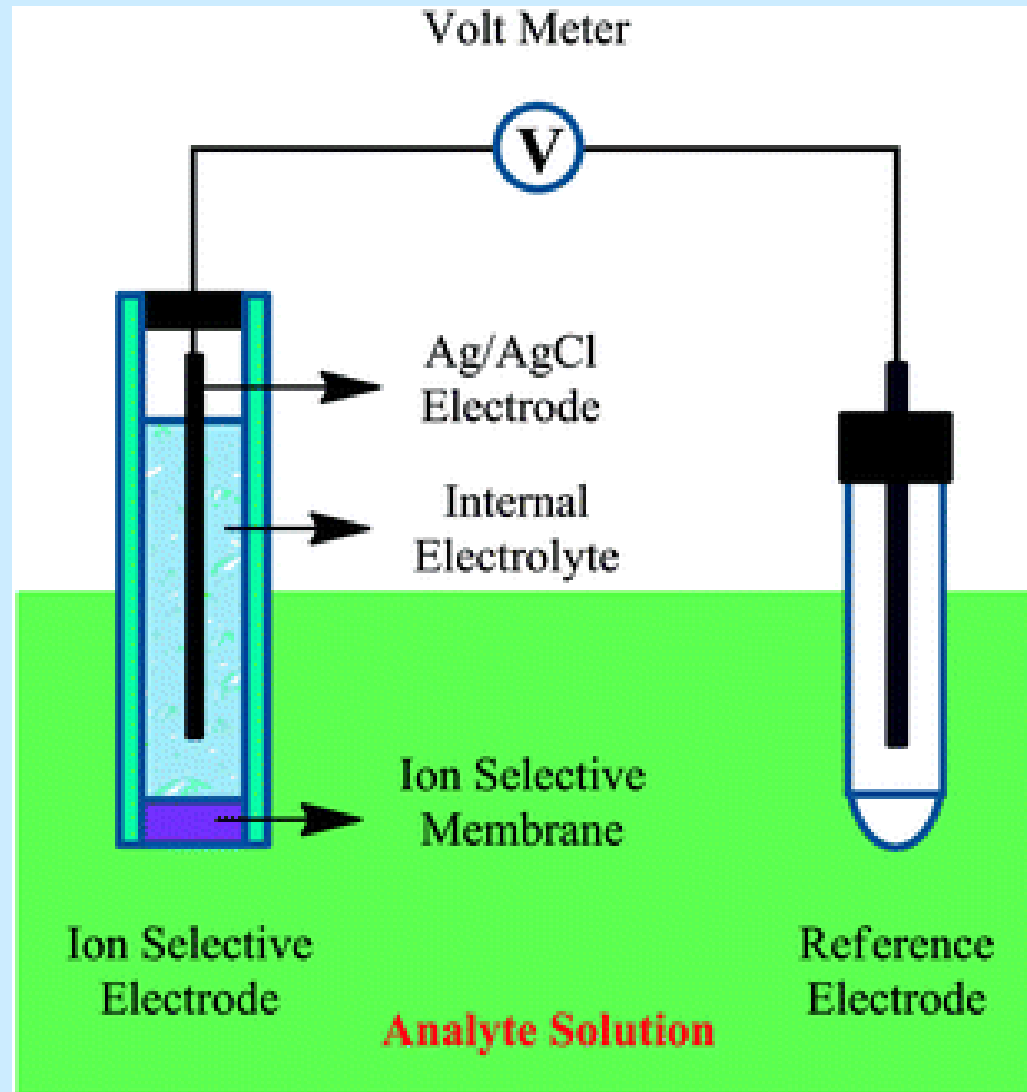
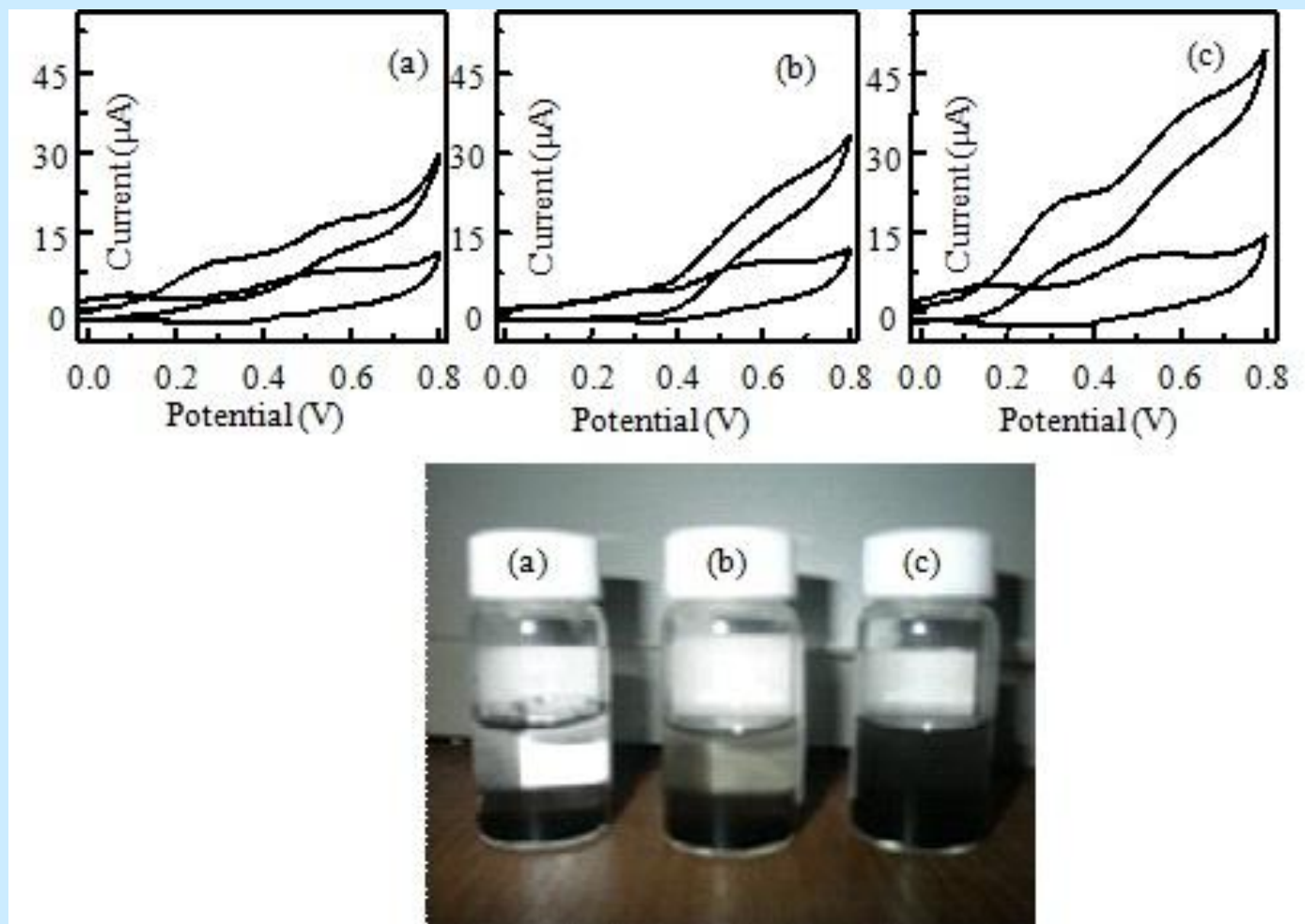


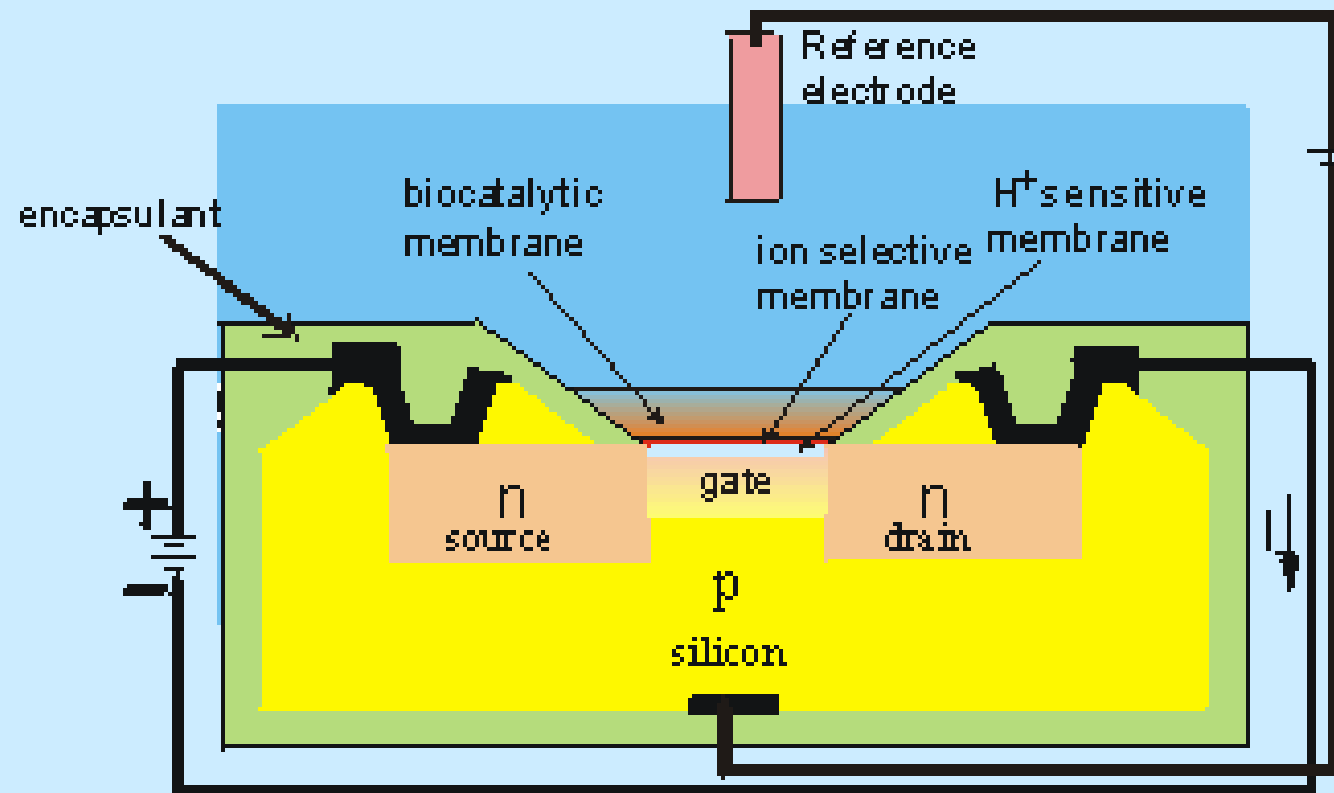
Схема вимірів з електрохімічним трансдюсером





Cyclic voltammetry of the biosensor response in the presence or absence of glucose.

ISFET

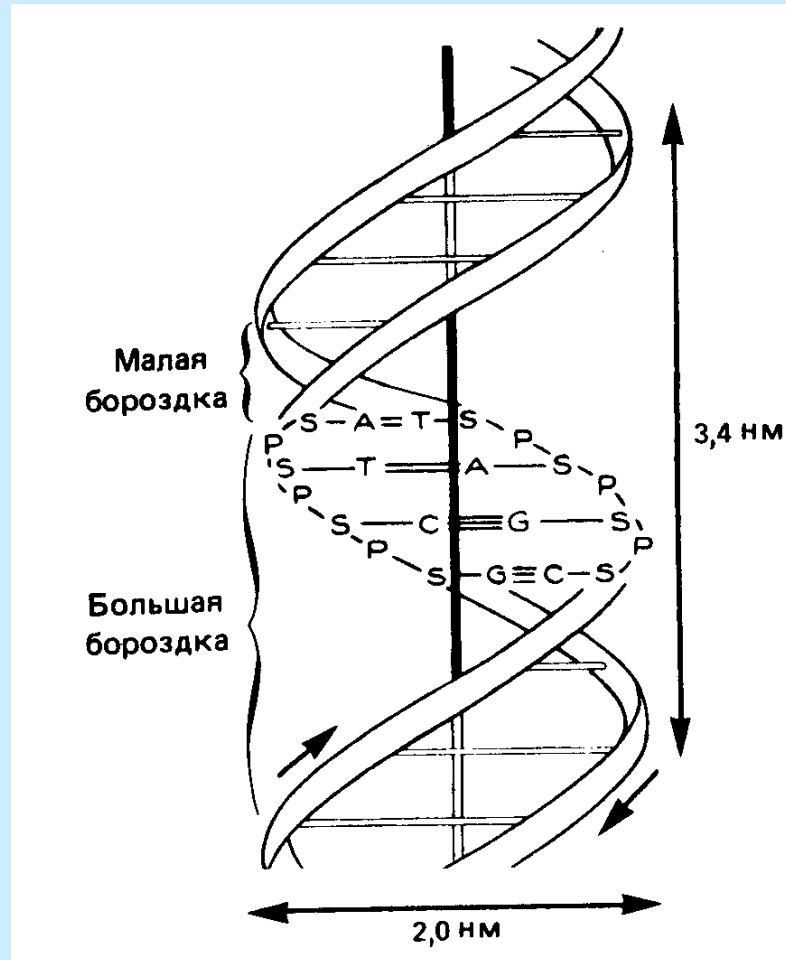


What is a DNA ?



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.



Principle of DNA chip

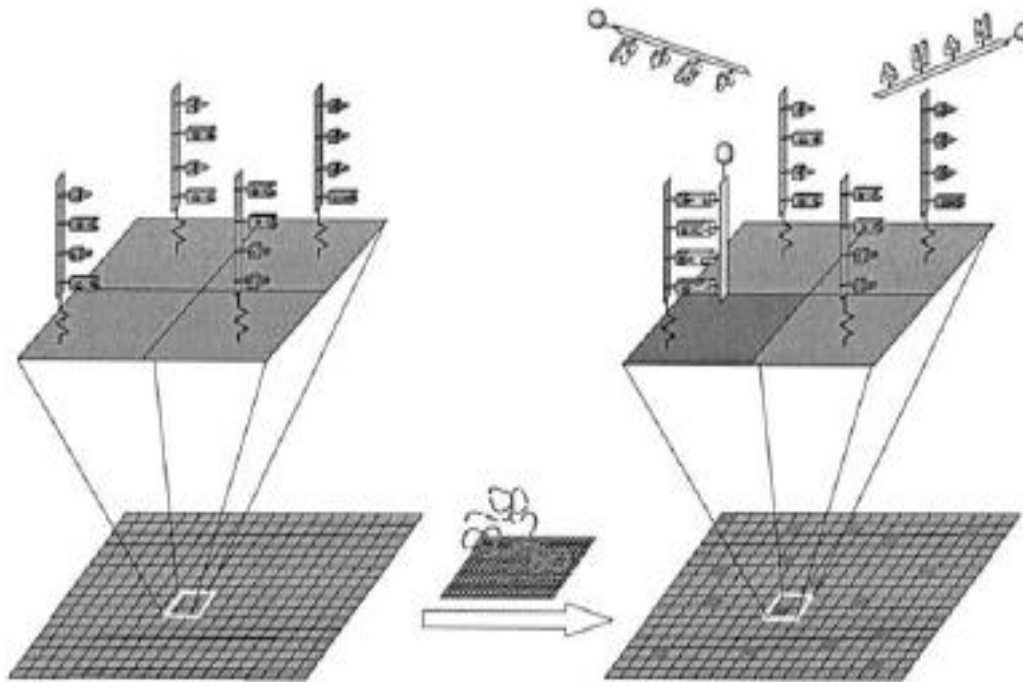
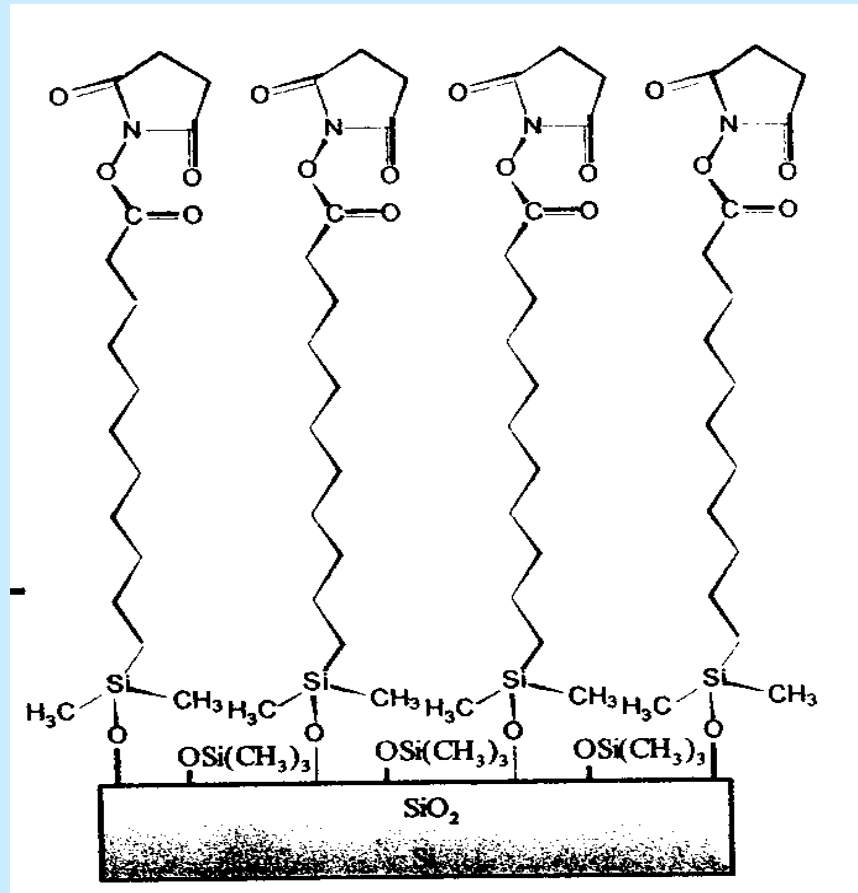


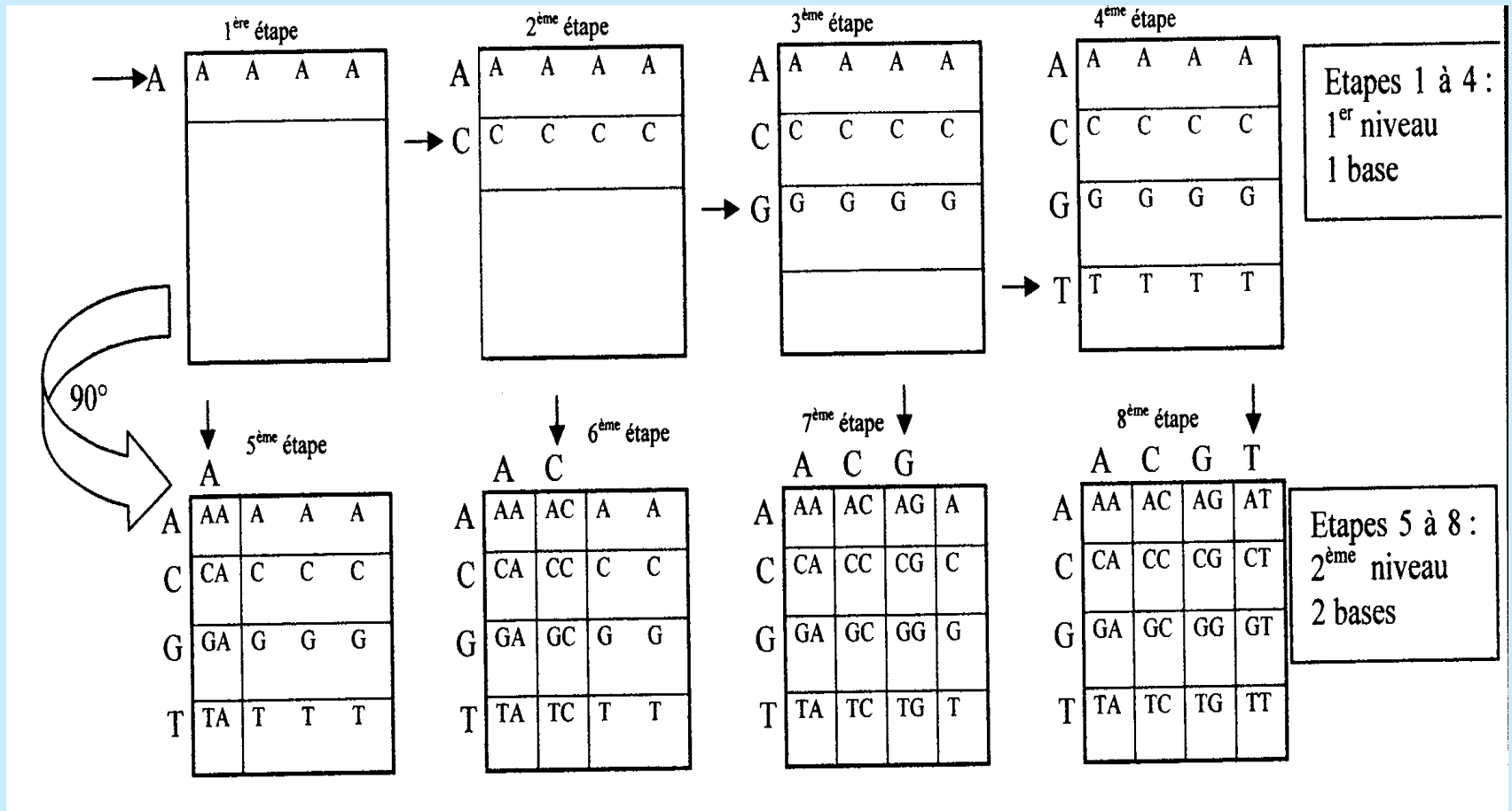
Fig. 2. Principle of DNA chips: on solid support, patchwork of active areas are arrayed. Each area contains one type of oligonucleotides (single DNA strands) as probes. DNA chips are dipped into a solution containing targets to be detected (various single DNA strands carrying markers). When targets are 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 syntesis



**DNA
EXTRACTION**
*via
conventional
methods*

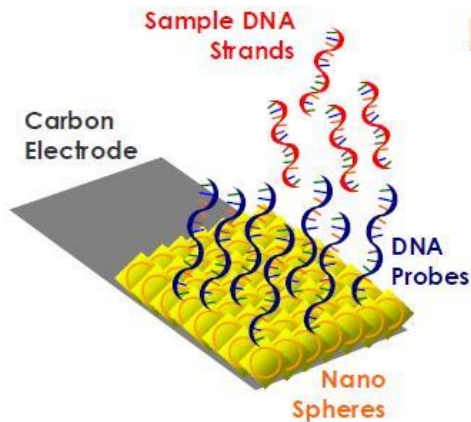


**DNA
AMPLIFICATION**
*Not required if
DNA amount >
limit of detection
 2.6×10^{-17} mol/liter*

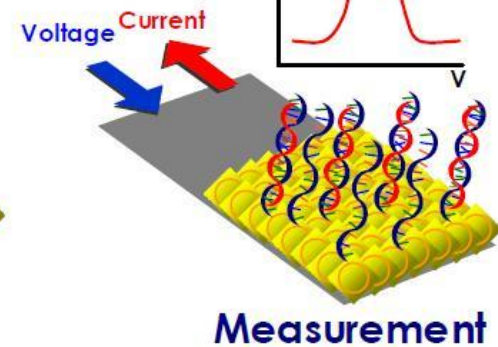
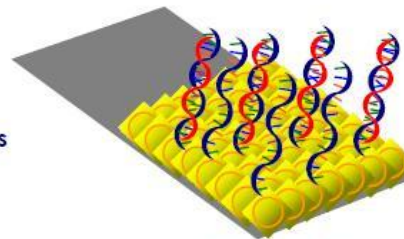


**DNA
DETECTION**
*using DNA
Biosensor via
Hybridisation
(see below)*

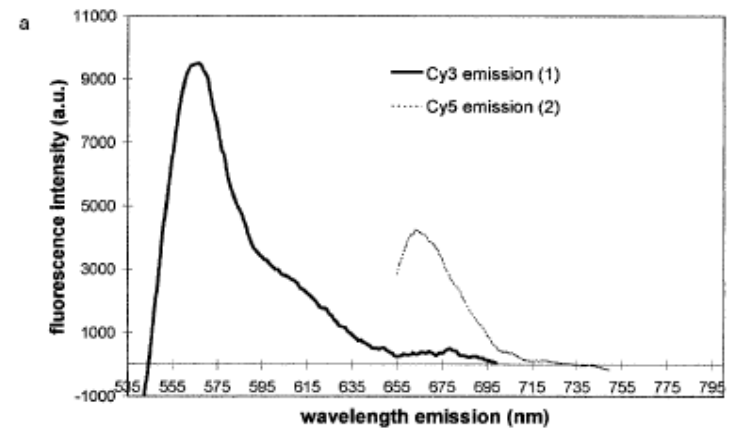
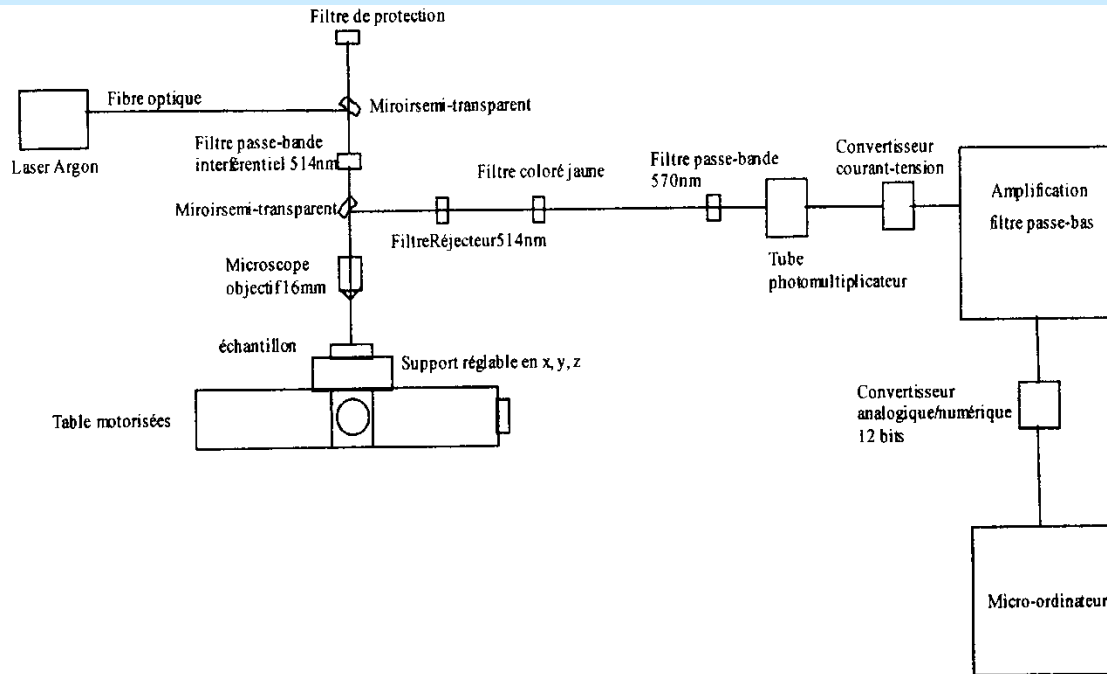
DNA BIOSENSOR DETECTION SEQUENCE



Hybridisation

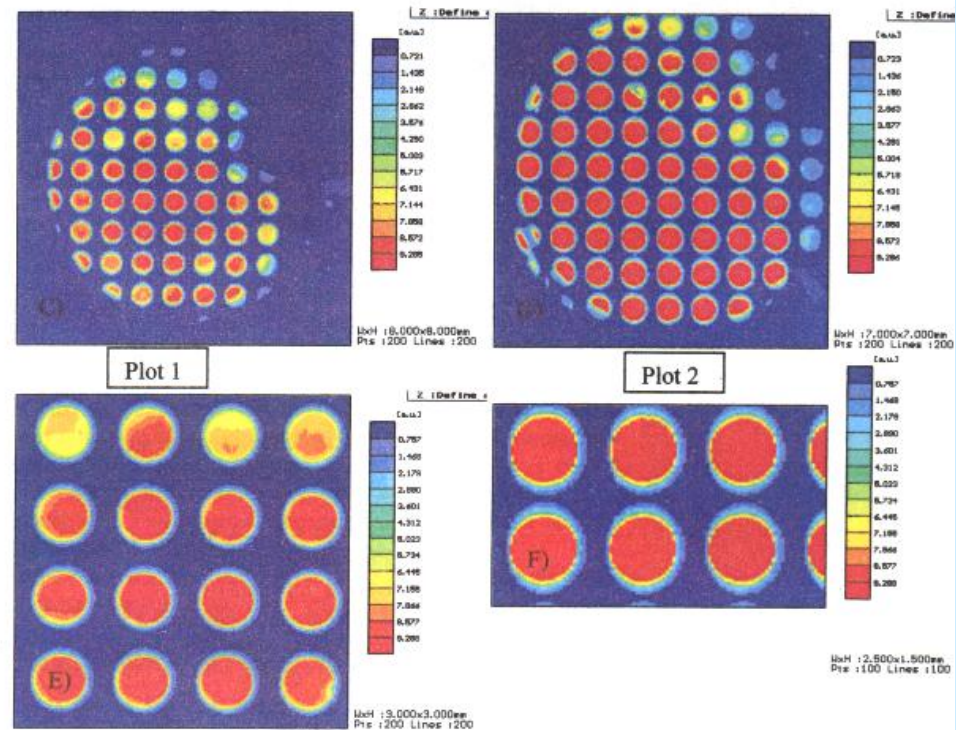
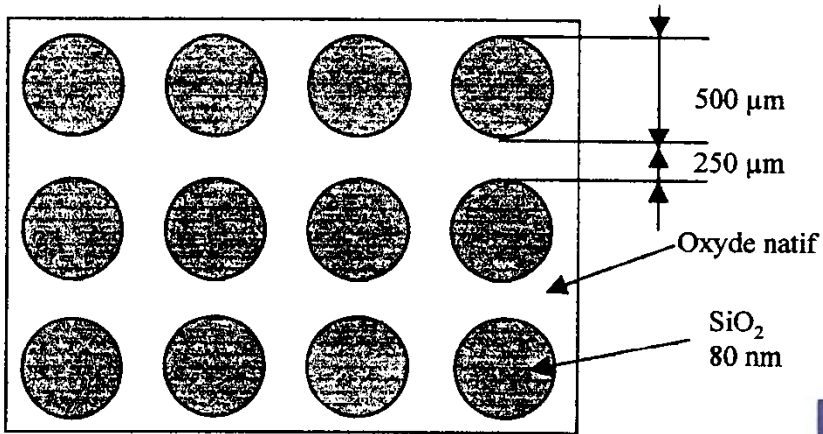


Fluorescence analysis

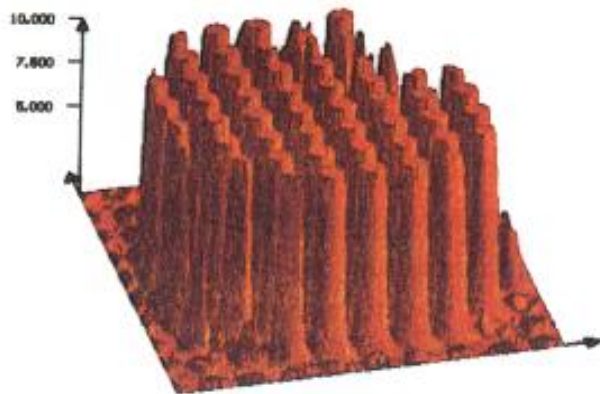


Fluorescence Mapping of DNA Sensor

Microstructuration du substrat



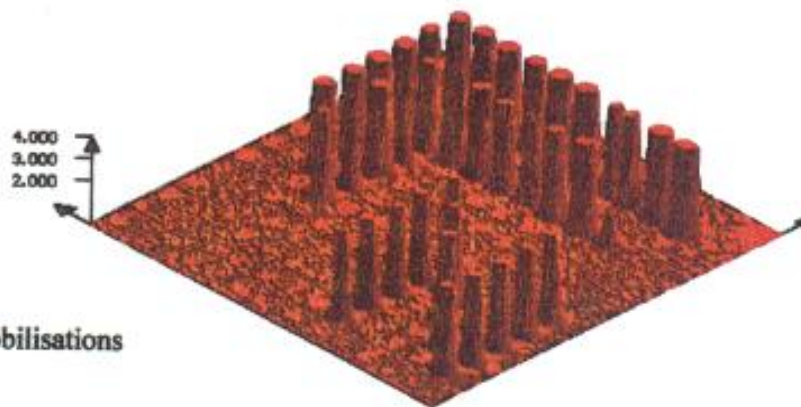
3D fluorescence mapping



Plot 1 (L185)



Plot 2 (U226)



Zone d'immobilisations

Microcavities and Bragg reflectors for DNA sensors

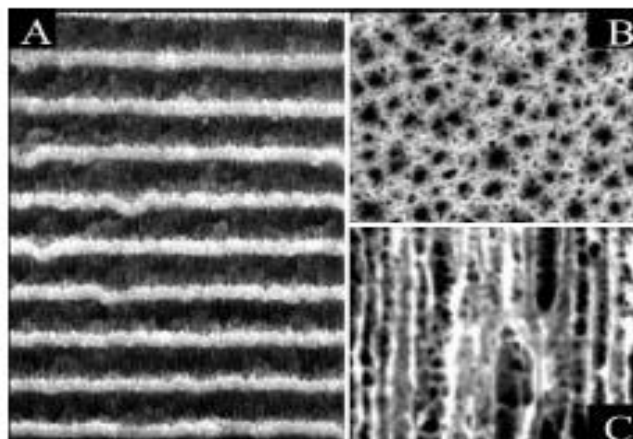


Fig. 1. [A] Cross-sectional SEM micrograph of a 10 period p+-oxidized porous silicon multilayer stack with overall thickness of 2.4 μm . The thickness of the low porosity layers (43%) is 80 nm and that of the high porosity layers (62%) is 160 nm. [B] Plan view SEM of the top porous silicon layer of a multilayer stack with pore diameter of ~ 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.

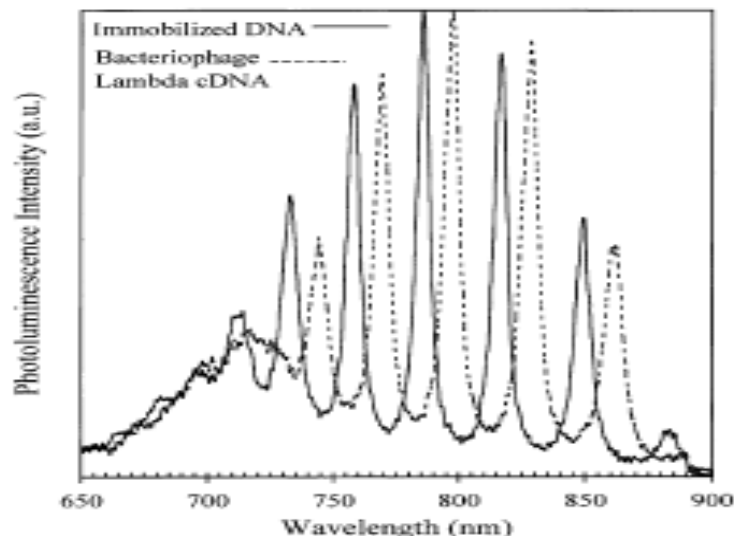


Fig. 7. Recognition and binding of bacteriophage lambda DNA to a 30 nucleotide complementary DNA sequence immobilized on the porous silicon sensor is confirmed by a 12-nm red-shift in the photoluminescence spectrum. The concentration of the sensing bacteriophage lambda DNA is 194.2 fM.

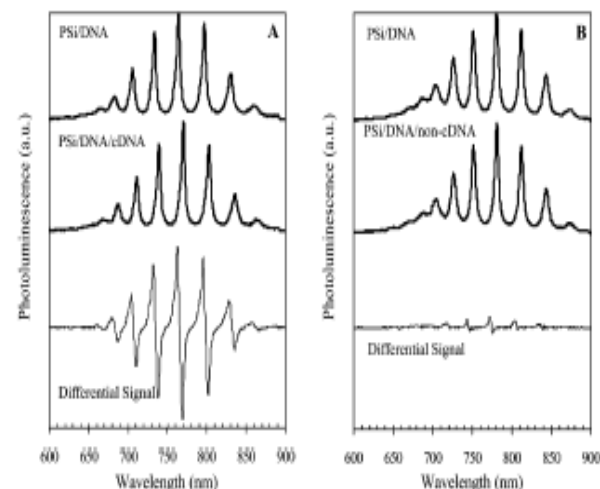


Fig. 6. 50 μM of DNA (TAG CTA TGG AAT TCC TCG TAG GCA) is attached to the porous silicon microcavity structure, shown as the top spectrum in both plots. 1 μM of complementary DNA is exposed to the DNA attached porous silicon and a 7-nm red-shift is observed after binding (middle spectrum of Fig. A). 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

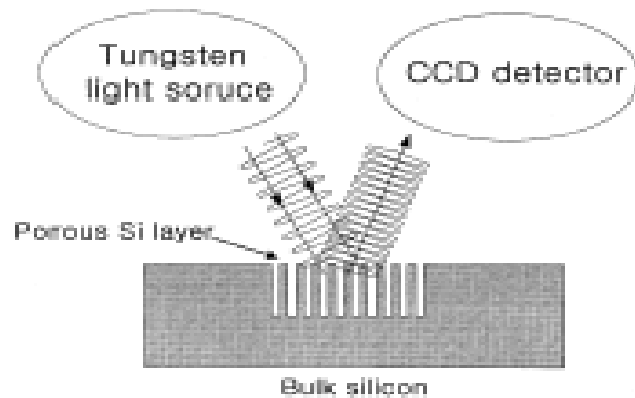


Fig. 2. Schematic of generation of Fabry–Pérot interference fringes.

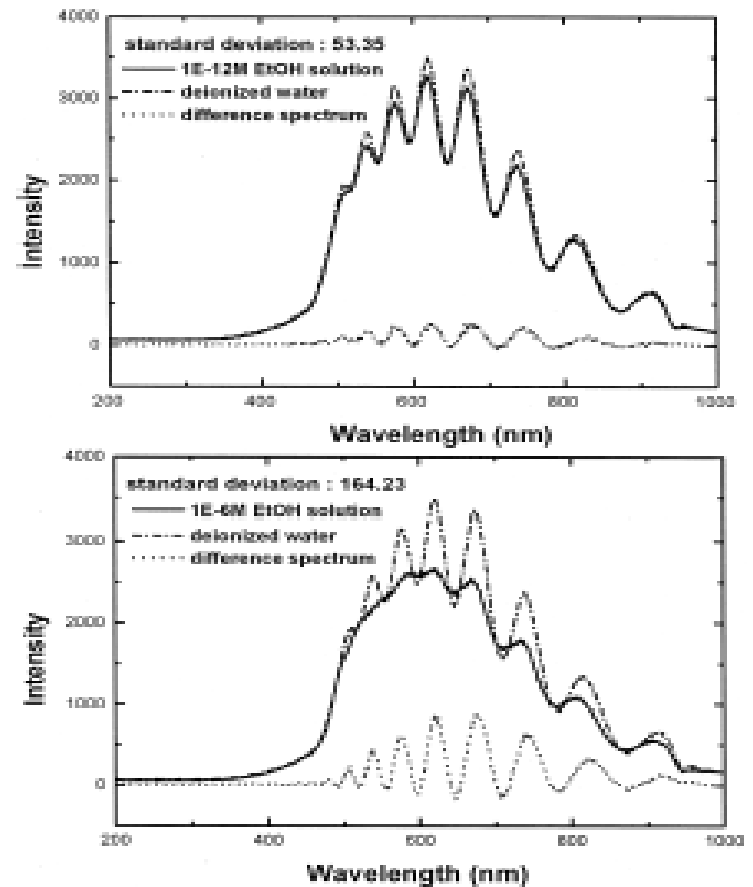


Fig. 4. Fabry–Pérot fringe patterns and difference spectra at 1×10^{-6} and 1×10^{-12} M ethanol concentrations.

FET sensor

