

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОПТИКЕ И ЭЛЕКТРОНИКЕ

УДК 621.382; 353-083; 53-088

ИНДИКАЦИЯ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ
С ПОМОЩЬЮ НАНОПРОВОЛОЧНОГО КНИ-БИОСЕНСОРА

© В. М. Генералов¹, О. В. Наумова², С. А. Пьянков¹, И. В. Колосова¹,
А. С. Сафатов¹, Б. Н. Зайцев¹, Э. Г. Зайцева², Г. А. Буряк¹,
А. А. Черемискина¹, Н. А. Филатова¹, А. Л. Асеев²

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека»,

630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово

² Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН,

630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

E-mail: general@vector.nsc.ru

Представлены результаты индикации вируса осповакцины с помощью нанопроволочных биосенсоров, изготовленных на основе плёнок кремний-на-изоляторе. В экспериментах использовались: вирус осповакцины, штамм ЛИВП из коллекции ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, сыворотка крови кролика, содержащая специфические поликлональные антитела к вирусу осповакцины. Исследования показали, что на разделе фаз «поверхность сенсора — вирусная суспензия» поливалентная сыворотка крови электрически нейтральна, вирус осповакцины положительно заряжен, комплексы поливалентной сыворотки крови и вируса осповакцины имеют эффективный отрицательный заряд.

Ключевые слова: биосенсор, кремний-на-изоляторе (КНИ), нанопроволока, вирус, осповакцина, индикация.

DOI: 10.15372/AUT20210105

Введение. В истории человечества были примеры катастрофических последствий, вызванных эпидемиями и пандемиями. По мнению некоторых экспертов, общие человеческие потери в новейшей истории от различных эпидемий превосходят сотни миллионов человек [1–4]. Эпидемии более эффективно предотвращаются, если удаётся оперативно выявить вызывающий их инфекционный агент. В настоящее время определённую угрозу человечеству могут представлять ортопоксвирусы [3]. Исходя из этого актуальной является задача их экспресс-индикации. Такая задача решается в данной работе для одного из представителей семейства ортопоксвирусов — вируса осповакцины.

Синергетический эффект между научными достижениями в области технических средств: контроля, методов экспресс-индикации патогенов в биомедицинских образцах, экспресс-отбора проб и их пробоподготовки, несомненно, позволит предотвратить скрытый характер применения бактерий, вирусов, токсинов с элементами биотерроризма.

Целью работы являлась индикация вируса осповакцины с помощью нанопроволочных (НП) сенсоров на основе полевых транзисторов кремний-на-изоляторе (КНИ).

Материалы и методы. В экспериментах использовались: биосенсоры на основе n -канальных нанопроволочных транзисторов (Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, Россия); сыворотка крови кролика, содержащая специфические поликлональные антитела (anti-body (AB)) к вирусу осповакцины (1 мл), титр в

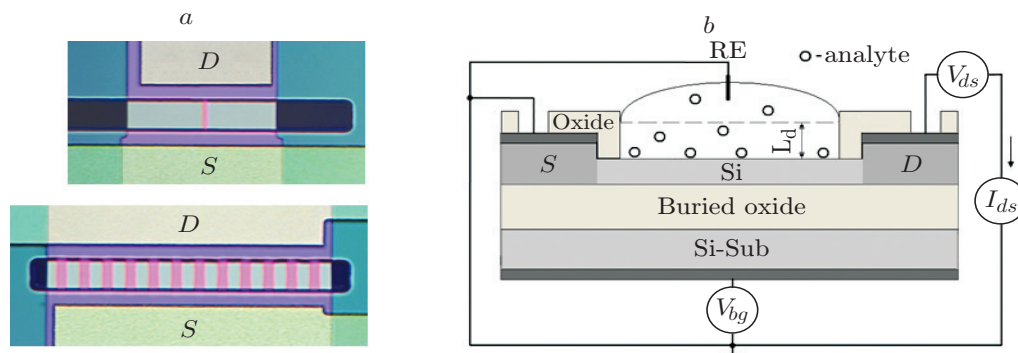


Рис. 1. Нанопроволочные биосенсоры и их структура: *a* — оптические изображения одно- и многоканальных сенсоров с контактными областями истока *S* и стока *D* и открытой для доступа аналита поверхностью; *b* — схематическое изображение биосенсора, RE — референсный (платиновый) электрод

иммуноферментной реакции против антигена осповакцины 1:50 000 (ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Россия); суспензия вируса осповакцины (VOV, штамм ЛИВП из коллекции ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Россия), инфекционный титр которой, по нашей оценке, составлял 10^8 шт/мл, а физический титр — 10^9 шт/мл; 2 %-ный раствор бета-пропиолактона, чистота 99 % (производство Cfm Oskar Tropitzsch GmbH, Германия); автоматические пипетки 1–2 мкл и 10–100 мкл (Ленпипет, Россия); атомно-силовой микроскоп ACM SOLVER P47BIO NT-MDT (Россия); электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония) с цифровой камерой Jeol и цифровой камерой бокового вывода с программным пакетом iTEM (SIS, Германия).

Вирус инактивировали бета-пропиолактоном. В пробирку с 0,5 мл VOV вносили 25 мкл 2 %-ного раствора бета-пропиолактона и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С.

На рис. 1, *a* показаны оптические изображения используемых в работе одно- и многоканальных сенсоров. Сенсоры были изготовлены на плёнках КНИ (SmartCut) с толщиной отсечённого слоя кремния 28–30 нм. Толщина скрытого диэлектрика (BOX, buried oxide) составляла 200 нм. Ширина сенсорного элемента *W* (с открытой для доступа аналита поверхностью), расположенного между контактными областями истока *S* и стока *D*, составляла 1 или 3 мкм, длина *L* — 10 мкм. Многоканальные сенсоры, содержащие 12 элементов с *W* = 3 мкм, были использованы для увеличения эффективной площади соответственно вероятности адсорбции аналита на их поверхность. Основные этапы изготовления сенсоров описаны в [5]. Во время измерений напряжение между стоком и истоком сенсора составляло $V_{ds} = 0,15$ В. Подложка структур КНИ (Si-Sub, рис. 1, *b*) использовалась в качестве управляющего электрода (затвора *bg*). Напряжение на *bg* обеспечивало выбор режима рабочей точки сенсора в подпороговой области $I_{ds}(V_{bg})$ -зависимости с оптимальным откликом к аналиту [6]. Непосредственно перед началом эксперимента сыворотку с поликлональными антителами к VOV разводили в деионизованной воде (DI) 100 раз. Полученную суспензию объёмом 1 мкл капельным способом наносили на поверхность чипа с набором сенсорных элементов. В течение одной минуты осуществлялась экспозиция суспензии с целью естественной адсорбции поликлональных антител на поверхность сенсора. Результаты адсорбции контролировались с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (рис. 2).

Непосредственно перед индикацией готовили серию десятикратных последовательных разведений вируса осповакцины в DI. Разведение осуществлялось в целях получения суспензии с низкой электрической проводимостью и исследования зависимости величины тока

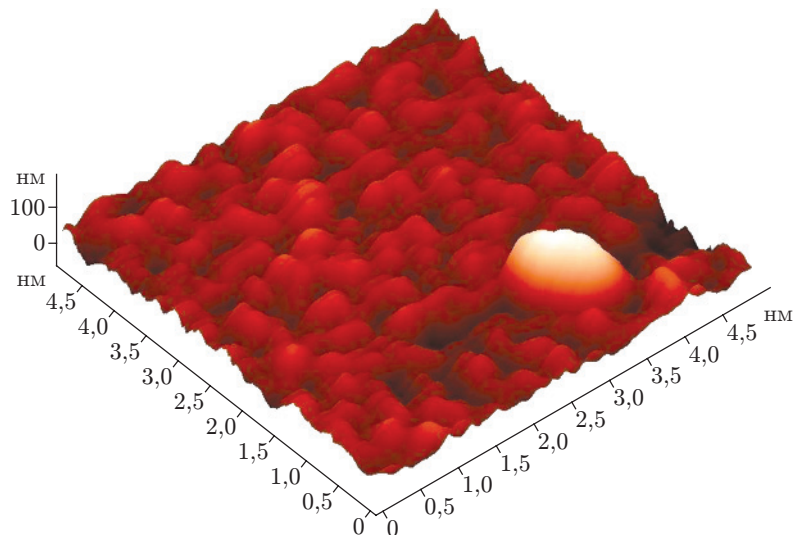


Рис. 2. АСМ-изображение слоя молекул поликлональной сыворотки на поверхности кремния

биосенсора от концентрации вируса осповакцины в тестируемой суспензии. Внесение разведений сыворотки крови кролика и вируса осповакцины проводили капельным способом с использованием автоматической пипетки. Объем капли составлял ~ 1 мкл. Реакция биосенсора на внесение суспензий сыворотки и вируса контролировалась через регистрацию временной зависимости тока сенсоров $I_{ds}(t)$ с использованием системы сбора данных NI 6363 (National Instrument, США).

Результаты и обсуждение. Для индикации и определения физического титра вирусных частиц суспензия исследовалась методом негативного контрастирования в просвечивающем электронном микроскопе. Обнаружены типичные для вируса осповакцины частицы размером около 280×200 нм и с характерными морфологическими признаками. Физический титр этих частиц составил 10^9 шт/мл (рис. 3).

На рис. 4 показаны зависимости $I_{ds}(t)$ для двух сенсоров, полученных при внесении на поверхность суспензии с вирусами осповакцины разной концентрации. Расстояние между сенсорами на чипе составляло $\sim 1,5$ мм. Абсолютные значения изменения сенсоров I_{ds} различаются, что отражает статистический характер физической адсорбции частиц по площади чипа. Общей тенденцией является уменьшение сенсоров I_{ds} с уменьшением разведения исходной суспензии VOV : DI. Поскольку тестируемая суспензия, кроме VOV, содержит белки питательной среды (см. рис. 3), то наблюдаемое на рис. 4 поведение (уменьшение тока сенсоров) I_{ds} означает, что эффективный заряд частиц, адсорбируемых на поверхность и в пределах длины экранирования Дебая (L_D) от поверхности сенсоров (см. рис. 1, b), в исследуемой суспензии является отрицательным.

На рис. 5, a показаны временные зависимости тока $I_{ds}(t)$, полученные после последовательного добавления на поверхность многоканального сенсора анализируемых проб — поликлональной сыворотки с антителами АВ и вируса осповакцины. Реперные точки на рис. 5: DI — момент внесения деионизованной воды, АВ — момент внесения суспензии поликлональной сыворотки с антителами, VOV — суспензия с вирусами осповакцины разной концентрации. Сразу после внесения DI или анализируемых проб начинается экспоненциальный процесс стабилизации тока сенсора $I_{ds}(t)$ с выходом на насыщение. Видно, что последовательное нанесение суспензии поликлональной сыворотки с АВ практически не изменяет стационарного значения I_{ds} , что указывает на нейтральный характер её воздей-

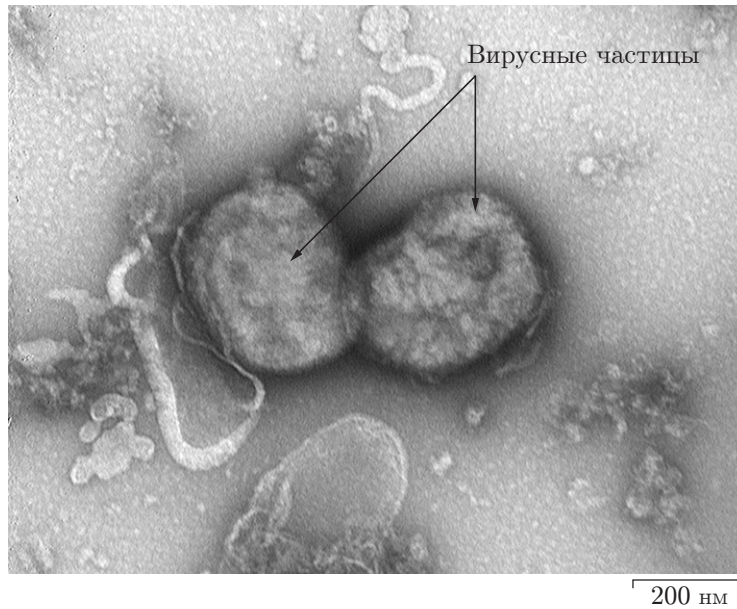


Рис. 3. Две частицы, морфологически идентифицированные как *Orthopoxvirus*. Изображение получено при определении физического титра вирусных частиц в исходной суспензии. Электронная микрофотография. Негативное контрастирование. Окраска 2 %-ным водным раствором уранилацетата

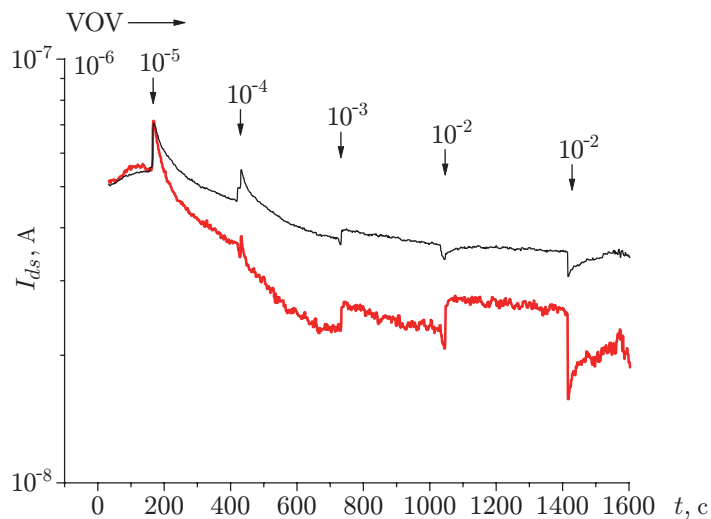


Рис. 4. Зависимости $I_{ds}(t)$ для двух одноканальных сенсоров на чипе (приведённые к одному уровню I_{ds} в суспензии VOV : DI = 10^{-6}), полученные после добавления на поверхность чипа суспензии с вирусом осповакцины разной концентрации

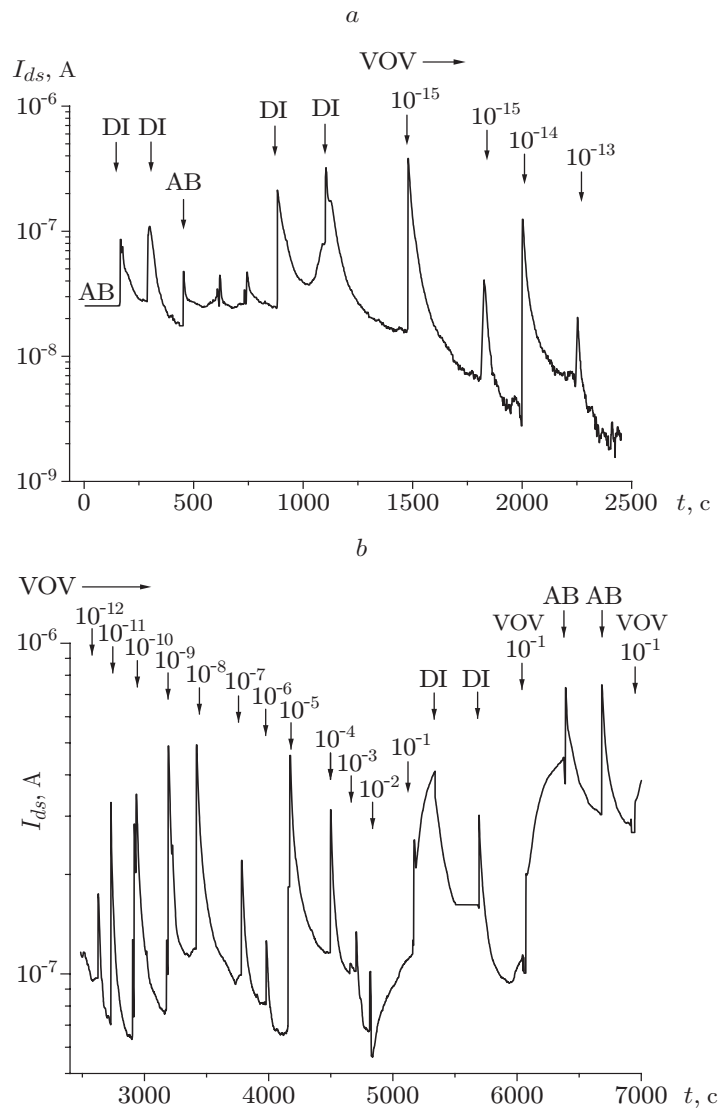


Рис. 5. Зависимости $I_{ds}(t)$ многоканального сенсора, полученные при внесении сыворотки АВ и после последовательного добавления на поверхность сенсора DI и вируса осповакцины: при $V_{bg} = 54$ В (а) и $V_{bg} = 60$ В (b)

ствия на сенсор. Вирусная суспензия осповакцины в разведении 10^{-15} раз на временном участке 1500 и 2000 с (см. рис. 5, а) приводит к уменьшению тока $I_{ds}(t)$. Подобная реакция возможна лишь при воздействии отрицательного заряда на поверхность сенсора. Можно сделать вывод, что комплекс АВ—VOV в исследуемой суспензии на разделе фаз «нанопроволока — вирусная суспензия» имеет отрицательный заряд. Однако численные оценки показывают, что вероятность наличия целостного вируса на поверхности нанопроволоки транзистора в указанном разведении крайне мала. Поэтому реакцию сенсора на внесение вирусной суспензии с низкой концентрацией VOV мы связываем с наличием большого количества отрицательно заряженных белков в суспензии. Аналогичные реакции продемонстрированы в [7, 8]. Следует отметить, что в диапазоне разведений VOV : DI = 10^{-12} – 10^{-2} (рис. 5, b) наблюдается немонотонная зависимость $I_{ds}(t)$. Такое поведение тока сенсоров возможно при адсорбции частиц разного знака, например, если VOV положительно за-

ряжены. Действительно, избыточное внесение вируса осповакцины (в разведении 10^{-1} в интервале 5000–7000 с) даёт явное увеличение тока сенсора, характерное при адсорбции положительно заряженных частиц. Реакция (уменьшение) I_{ds} на последующее внесение АВ подтверждает, что комплексы антиген+антитело в результате специфического взаимодействия поливалентной сыворотки и вируса осповакцины в исследуемой суспензии имеют отрицательный заряд.

Таким образом, сложный характер зависимости $I_{ds}(t)$ сенсоров при индикации АВ и VOV в исследуемых суспензиях объясняется тремя процессами адсорбции: отрицательно заряженных белков, положительно заряженных VOV и отрицательно заряженных комплексов АВ—VOV.

Полученные оригинальные результаты и сравнение возможностей метода и технологии индикации вируса осповакцины с помощью КНИ-транзисторов с подобными, например полимеразной цепной реакцией иммунохимическим методом, подтверждают его высокую эффективность и технологичность [8–16]. Авторы полагают, что метод индикации патогенов с помощью используемых сенсоров имеет хорошие перспективы практического применения в медицине, вирусологии, в частности в целях мониторинга эпидемиологической ситуации в местах скопления большого количества людей (метро, стадионах, аэропортах и др.) [17]. Он также может быть востребован и для нужд сельского хозяйства и животноводства. Использование сенсоров в медицине как средства измерения требует их сертификации в качестве медицинского изделия и решения ряда задач, связанных с определением величины достоверности результатов. Очевидно, в единичном эксперименте отсчёты случайной величины тока $I_{ds}(t)$ для каждого разведения, представленные на рис. 4, не могут быть предсказаны с необходимой точностью. Существует общее правило: если достоверность измерений не определена, то есть основания результаты измерений считать оценкой и даже ставить их под сомнение. На практике ожидаемая точность (функция достоверности) результатов измерения случайной физической величины, например $I_{ds}(t)$, достигается сбором и анализом результатов репрезентативной выборки. С позиции метрологии достоверность является итогом решения комплекса задач, включающих использование аттестованных методик, средств измерений утверждённого типа, поверки средств измерений, единиц измерений, допущенных к применению в России и др. Поверенные средства измерения устраняют фактор субъективности в интерпретации результатов, который ещё встречается в медицине. С позиции математической статистики достоверность измерений определяется в том числе с учётом использования априорной или безусловной вероятности отклонения результатов измерения от истинного значения измеряемой величины. В крайнем случае достоверность измерений сверху находится из неопределённости по типу А путём статистического анализа ряда наблюдений [18]. Очевидно также, что применяемые в работе многоканальные сенсоры увеличивают достоверность получаемых результатов. Так, каждая точка, представленная на рис. 5, *a*, *b*, является результатом усреднения по 12 сенсорным элементам.

Заключение. Поливалентная сыворотка является электрически нейтральной на разделе фаз «поверхность нанопроволоки — вирусная суспензия»; вирус осповакцины является электрически положительным на разделе фаз «поверхность нанопроволоки — вирусная суспензия»; комплексы поливалентной сыворотки и вируса осповакцины имеют отрицательный заряд на разделе фаз «поверхность нанопроволоки — вирусная суспензия»; время эффективной индикации вируса осповакцины поливалентной сывороткой с помощью НП КНИ-сенсоров в исследуемых пробах осуществляется в реальном масштабе времени и составляет 200–300 с на одну пробу; чувствительность НП КНИ-сенсоров позволяет осуществлять индикацию белков VOV, находящихся в суспензии.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Д. В. Щеглову за организационную поддержку работы и О. С. Таранову за предоставленные электронные фотографии вируса осповакцины.

Финансирование. Пробоподготовка осуществлялась в рамках Государственного задания ГЗ 11/16 отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями». Изготовление сенсоров и индикация вирусов осуществлялись в ИФП СО РАН при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-02091).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Как это было:** Программа глобальной ликвидации оспы в воспоминаниях её участников / Под ред. проф. С. С. Маренниковой. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. 276 с.
2. **Shchelkunova G. A., Shchelkunov S. N.** 40 Years without smallpox // *Acta Naturae*. 2017. **9**, N 4. P. 4–12.
3. **Щелкунов С. Н.** Возможен ли возврат оспы? // *Молекулярная медицина*. 2011. № 4. С. 36–41.
4. **Сергеев А. Н., Сафатов А. С., Генералов В. М. и др.** Высокопатогенный грипп птиц за рубежом и в России: стратегия борьбы и профилактики // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2006. № 1. С. 5–11.
5. **Naumova O. V., Fomin B. I., Nasimov D. A. et al.** SOI nanowires as sensors for charge detection // *Semiconductor Sci. Technol.* 2010. **25**, N 5. P. 055004.
6. **Наумова О. В., Фомин Б. И.** Оптимизация отклика нанопроволочных биосенсоров // *Автометрия*. 2016. **52**, № 5. С. 21–25. DOI: 10.15372/AUT20160503.
7. **Иванов Ю. Д., Мальсагова К. А., Плешакова Т. О. и др.** Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016. **60**, № 1. С. 94–98.
8. **Генералов В. М., Наумова О. В., Фомин Б. И. и др.** Индикация белка VP40 вируса Эбола с помощью КНИ-нанопроволочного биосенсора // *Автометрия*. 2019. **55**, № 6. С. 102–108. DOI: 10.15372/AUT20190613.
9. **Вирусология** / Под ред. Б. Филдса, Б. Найпа. Т. 1. М.: Мир, 1989. 494 с.
10. **Makowski M. S., Ivanisevic A.** Molecular analysis of blood with micro-/nanoscale field-effect-transistor biosensors // *Small*. 2011. **7**, N 14. P. 1863–1875.
11. **Yang F., Zhang G.-J.** Silicon nanowire-transistor biosensor for study of molecule-molecule interactions // *Rev. Anal. Chem.* 2014. **33**, N 2. P. 95–110.
12. **Мальсагова К. А., Иванов Ю. Д., Плешакова Т. О. и др.** КНИ-нанопроволочный биосенсор для детекции белка D-NFAT 1 // *Биомедицинская химия*. 2015. **61**, № 4. С. 462–467.
13. **Park J., Nguyen H. H., Woubit A., Kim M.** Applications of field-effect transistor (FET)-type biosensors // *Appl. Sci. Conver. Technol.* 2014. **23**, N 2. С. 61–71.
14. **Cherpillod P., Schibler M., Vieille G. et al.** Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures // *Journ. Clinical Virology*. 2016. **77**. P. 9–14.
15. **Максютов Р. А.** Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016. № 4. С. 60–63.
16. **Полтавченко А. Г., Ёрш А. В., Таранов О. С. и др.** Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae) // *Вопросы вирусологии*. 2019. **64**, № 6. С. 291–297.

17. **Chen K.-I., Li B.-R., Chen Y.-T.** Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation // Nano Today. 2011. **6**, N 2. P. 131–154.
18. **ГОСТ Р 54500.3-2011.** Руководство ИСО/МЭК 98-3:2008. Неопределённость измерения. Ч. 3: Руководство по выражению неопределённости измерения. М.: СтандартИнформ, 2012. 100 с.

Поступила в редакцию 08.07.2020

После доработки 08.09.2020

Принята к публикации 21.12.2020
