

14

## Биосенсоры на основе графена

© А.А. Лебедев<sup>1,2</sup>, В.Ю. Давыдов<sup>1</sup>, С.Н. Новиков<sup>3</sup>, Д.П. Литвин<sup>1,4</sup>,  
Ю.Н. Макаров<sup>4,5</sup>, В.Б. Климович<sup>6</sup>, М.П. Самойлович<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия

<sup>3</sup> Aalto University, Tietotie 3, 02150, Espoo, Finland

<sup>4</sup> ГК „Нитридные кристаллы“, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Nitride Crystals Inc., 181 E Industry Court, Suite B, Deer Park, NY 11729, USA

<sup>6</sup> Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Россия

<sup>7</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

E-mail: shura.lebe@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 1 марта 2016 г.

Представлены результаты по разработке и тестированию сенсора на основе графена для регистрации белковых молекул. Для проверки работоспособности биосенсора была выбрана иммунохимическая система, состоящая из флуоресцеина и моноклональных антител, связывающих этот краситель. Была обнаружена чувствительность датчика к концентрации флуоресцеина на уровне 1–10 ng/ml и к концентрации конъюгата бычьего сывороточного альбумина с флуоресцеином на уровне 1–5 ng/ml. Показано, что разработанный прибор имеет большие перспективы для ранней диагностики различных заболеваний.

Открытие способности углерода к формированию двумерной модификации (графена) привело к взрывному росту публикаций по исследованию свойств этого материала и его возможному применению в электронике [1]. Известно, что графен как двумерный материал обладает уникальным набором электрофизических свойств: высокой подвижностью носителей заряда в сочетании с их малой концентрацией; максимально возможным отношением площади к объему; низким уровнем шумов. Сочетание этих свойств приводит к тому, что адсорбция минимального количества примеси на поверхность графена может заметно изменить его общую проводимость. Таким образом,

графен является весьма перспективным материалом для изготовления различных типов сенсоров.

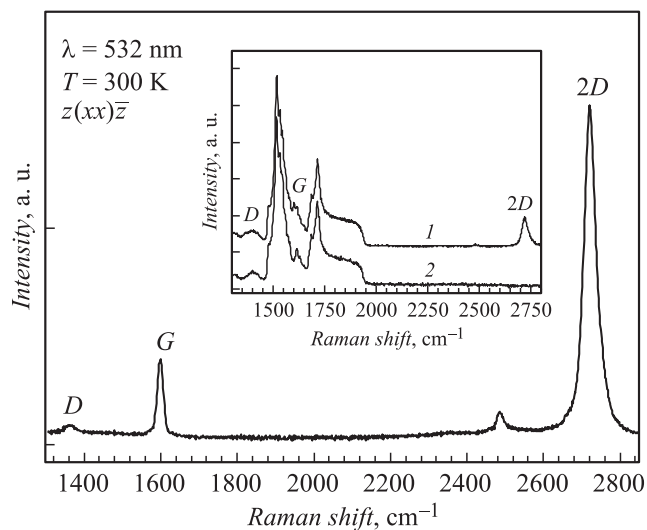
В работе [2] было показано, что графен способен чувствовать адсорбцию даже одной молекулы. Присоединенные молекулы газа в зависимости от их заряда и типа проводимости графеновой пленки ведут себя как доноры или акцепторы, т.е. изменяют концентрацию подвижных носителей заряда. В результате в зависимости от типа адсорбированной молекулы наблюдалось уменьшение или увеличение сопротивления пленки [3–4].

Следует отметить, что одним из серьезных недостатков графенового газового сенсора является отсутствие селективности. Действительно, по изменению проводимости нельзя сказать, какая именно молекула адсорбировалась на поверхность графена. Более того, некоторые молекулы дают вклады противоположного знака; таким образом, суммарное изменение сопротивления может быть близко к нулю. Проблему селективности датчика на основе графена можно решить путем использования реакции антиген–антитело. Компоненты этой пары могут взаимодействовать только друг с другом и ни с какими другими белками. Известно, что на определенных стадиях многих заболеваний человека в крови появляются антигены-маркеры, специфичные для одного или для группы заболеваний. Эти антигены могут взаимодействовать со специфичными антителами, предварительно нанесенными на поверхность графенового сенсора. Реакция, как и в случае газового сенсора, приводит к изменению сопротивления графеновой пленки.

Использование пары антиген–антитело позволяет решить проблему селективности биосенсора и открывает очень широкие возможности для использования датчиков на основе графена в медицине и биологии. Этот подход может привести к созданию портативных биосенсоров, способных в режиме экспресс-анализа выявлять в биологических жидкостях диагностически значимые маркеры заболеваний, которые в настоящее время детектируются только с помощью трудоемкой и продолжительной процедуры иммуноферментного анализа [5].

Задачей настоящей работы было изготовление и тестирование биосенсора на основе графена, полученного термодеструкцией поверхности SiC.

Пленки графена были выращены на полуизолирующих подложках SiC политипа 6H методом термического разложения карбида кремния при температуре около 1700°C. Перед ростом графена подложка



**Рис. 1.** Типичный рамановский спектр пленки графена, выращенной на подложке 6H-SiC. На вставке показан спектр структуры графен/6H-SiC (1) и спектр, полученный от подложки 6H-SiC (2).

травилась при  $1600^\circ\text{C}$  в атмосфере водорода для удаления дефектного слоя с поверхности.

На рис. 1 в рамановском спектре, полученном от структуры графен/6H-SiC (спектр 1 на вставке), в основном доминируют широкие интенсивные полосы. Эти полосы обусловлены процессами второго порядка для рассеяния света от подложки 6H-SiC, что сильно препятствует получению детальной информации о спектре графеновой пленки. Из спектра 1 был вычтен спектр чистой подложки 6H-SiC, который был получен при аналогичных условиях измерения (спектр 2 на вставке рис. 1). Разностный спектр содержит линии G ( $\omega \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ), 2D ( $\omega \sim 2720 \text{ cm}^{-1}$ ) и слабую линию D ( $\omega \sim 1360 \text{ cm}^{-1}$ ), которые характерны для рассеяния света на графеновой пленке. В работе [6] было показано, что отношение интенсивностей линий G и 2D может быть использовано для оценки количества монослоев в графене. Было установлено, что отношение интенсивностей пиков  $I_G/I_{2D} \sim 0.24$  указывает на монослойность графена.

Линия  $D$  не должна наблюдаться в спектрах структурно-совершенных образцов графена, однако она может появляться в них при наличии рассеяния на дефектах. Как было показано в работах [7], отношение интенсивностей линий  $D$  и  $G$  ( $I_D/I_G$ ) может быть использовано для оценки структурного качества графеновой пленки: чем меньше это значение, тем совершеннее пленка. Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что значение отношения ( $I_D/I_G$ ) не превышает  $1/8$ , что говорит о хорошем структурном совершенстве выращенных пленок графена.

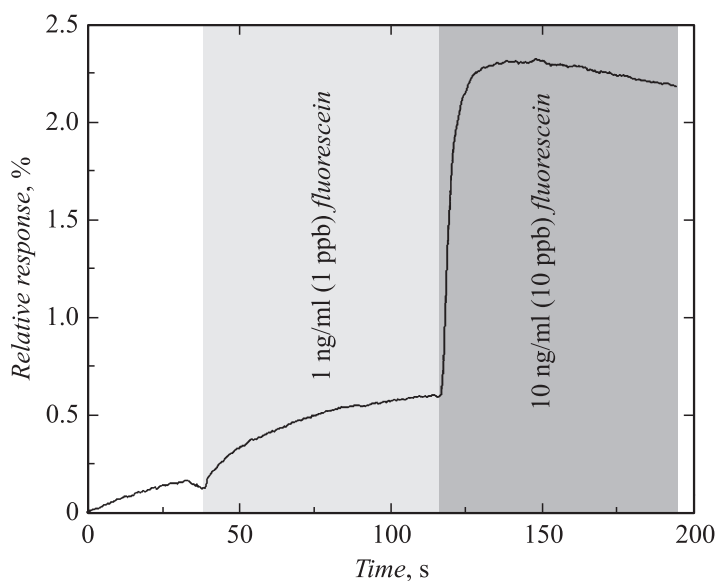
Положение линии  $G$  ( $\omega \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ), регистрируемое в спектре графеновой пленки, существенно отличается от положения линии  $G$  ( $\omega \sim 1580 \text{ cm}^{-1}$ ), которое характерно для недеформированного кристаллического графита. Наблюдаемый высокочастотный сдвиг линии  $G$  можно объяснить напряжениями сжатия, которые возникают вследствие разницы рассогласования параметров решетки и коэффициентов термического расширения графена и SiC.

В работе [8] было показано, что в рамках модели двуслойной деформации величину напряжений сжатия  $\sigma$  в плоскости графенового слоя можно оценить с использованием соотношения  $\omega_\sigma - \omega_0 = \alpha\sigma$ ; здесь  $\omega_\sigma$  — положение  $G$ -линии в спектре исследуемой структуры графен/SiC;  $\omega_0 = 1580 \text{ cm}^{-1}$  — частота  $G$ -линии в рамановском спектре недеформированного кристаллического графита;  $\alpha$  — деформационный коэффициент графита, который равен  $\alpha = 7.47 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$ . Для полученных в данной работе графеновых пленок величину напряжений сжатия можно оценить как  $\sigma = 2.7 \pm 0.1 \text{ GPa}$ .

Ti/Au-контакты к графену были сформированы с помощью электронно-лучевого испарения и взрывной фотолитографии. Чип датчика размером  $2 \times 2 \text{ mm}$  был приклеен на керамический держатель и распаян с помощью Au-проводов. Проводящий канал графенового датчика был модифицирован с помощью реакции диазотизации.

Для разработки технологии изготовления биосенсора на основе графена была выбрана иммунохимическая система, состоящая из флуоресцеина и моноклональных антител (МКАТ), связывающих флуоресцеин, в виде как свободных молекул, так и химической группы, ковалентно присоединенной к белковым носителям. Молекулярная масса флуоресцеина ( $0.332 \text{ kDa}$ ) сопоставима с размерами ряда биологически значимых маркерных молекул, таких как гормоны, нуклеотиды и некоторые короткие пептиды.

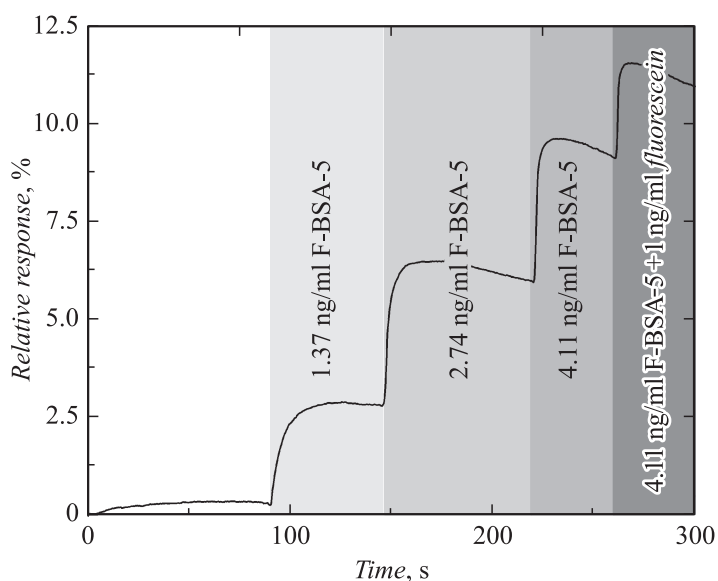
Флуоресцеин в течение многих лет применяли в качестве флуорохрома для мечения антител, используемых в люминесцентной микро-



**Рис. 2.** Изменение сопротивления датчика при контакте с растворами, содержащими указанные на графике концентрации свободного флуоресцеина. По оси ординат изменение сопротивления (%), по оси абсцисс — время контакта с растворами (s).

скопии. Его изотиоцианатное производное (FITC) в мягких условиях образует устойчивые ковалентные связи с белками, при этом свойства модифицированных белков изменяются мало, а количество присоединенных молекул флуорохрома определяют спектрофотометрически [9]. Флуоресцеин, ковалентно присоединенный к белкам, так же как свободная молекула, поглощает свет с длиной волны 488 nm и излучает в желто-зеленой области (495–522 nm) [10].

Для разработки технологии нанесения антител на поверхность графена были использованы полученные в лаборатории гибридной технологии РНЦ РХТ мышинные МКАТ против флуоресцеина (код антител F2A3). Образец графена был помещен в раствор 2 μM 4-нитробензол диазоний тетрафлюобората (НДТ) и 0.1M тетрабутиламмоний тетрафлюобората в ацетонитриле. После присоединения нитрофениловых групп к поверхности графена проводилось восстановление нитрофени-



**Рис. 3.** Изменение сопротивления датчика при контакте с растворами, содержащими указанные на графике концентрации конъюгата БСА с флуоресцеином (F-BSA-5) или смесь конъюгата и свободного флуоресцеина. По оси ординат изменение сопротивления (%), по оси абсцисс — время контакта с растворами (s).

ловых групп в фениламинные. Электрохимическая реакция проводилась в 0.1M растворе KCl в смеси воды и этилового спирта 9:1. Постоянное напряжение  $-0.9\text{ V}$  прикладывалось между Ag/AgCl-электродом и графеновым электродом [11]. Активированные графеновые образцы погружались в раствор антитела F2A3 и выдерживались 5 h при  $+4^\circ\text{C}$ , затем споласкивались водой и высушивались.

Измерения отклика датчика производились в режиме постоянного приложенного напряжения 50 mV, при этом регистрировалось изменение тока через графеновый резистор. Отклик датчика  $r$  на измеряемый реагент рассчитывался по формуле  $r = I - I_0/I_0$ , где  $I$  — ток через датчик,  $I_0$  — ток перед внесением реагента. Измерения проводились в боратном буферном растворе. Испытания датчика на основе графена с нанесенными на его поверхность МКАТ против флуоресцеина показали,

что при контакте с растворами, содержащими низкомолекулярный лиганд в концентрациях 1 или 10 ng/ml, электрическое сопротивление сенсора отчетливо изменялось (рис. 2).

В качестве высокомолекулярного лиганда в работе был использован приготовленный в лаборатории препарат бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцеином (F-BSA-5). Молекулярная масса F-BSA-5 (69 kDa) сопоставима с размерами белков, используемых в качестве маркеров заболеваний человека. В составе конъюгата с F-BSA-5 каждая химическая группа флуоресцеина составляет около 5% массы молекулы. По данным спектрофотометрии использованный в работе конъюгат содержал по 3 группы флуоресцеина на 1 молекулу F-BSA-5. При контакте с раствором высокомолекулярного лиганда (F-BSA-5) изменения электрического сопротивления датчика были зарегистрированы при концентрациях конъюгата 1.37–3.11 ng/ml (рис. 3). После контакта с раствором, содержащим F-BSA-5 в наибольшей концентрации, датчик сохранял способность реагировать на добавление в раствор свободного низкомолекулярного лиганда в концентрации 1 ng/ml. Полученные данные указывают на то, что датчик на основе графена и нанесенных на его поверхность МКАТ способен присоединять не только низкомолекулярные лиганды, такие как флуоресцеин, но и белковые макромолекулы, масса которых по крайней мере в 20 раз превышает размеры низкомолекулярных лигандов.

Диагностика заболеваний человека в настоящее время в значительной мере основана на определении концентраций или присутствии в крови определенных маркерных молекул, специфичных для одного или целой группы заболеваний. Выявление диагностически значимых макромолекул выполняется с помощью длительного и трудоемкого метода иммуноферментного анализа. Применение биологических сенсоров на основе графена позволит ускорить и технически усовершенствовать процесс диагностики заболеваний человека.

## Список литературы

- [1] *Novoselov K.S., Geim A.K., Morozov S.V. et al. // Science. 2004. V. 306. P. 666.*
- [2] *Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V. et al. // Nat. Mater. 2007. V. 6. P. 652.*
- [3] *Pearce R., Iakimov T., Anderson M. et al. // Sens. Actuators. 2011. V. 155. P. 451.*
- [4] *Лебедев А.А., Лебедев С.П., Новиков С.Н. и др. // ЖТФ. 2016. Т. 86. С. 135.*

- [5] *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. школа, 1991. 288 с.
- [6] *Ferrari A.C., Meyer J.C., Scardaci V.* et al. // *Phys. Rev. Lett.* 2006. V. 97. P. 187 401.
- [7] *Pimenta M.A., Dresselhaus G.* et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. V. 9. P. 1276.
- [8] *Ni Z.H., Chen W., Fan X.F.* et al. // *Phys. Rev. B.* 2008. V. 77. P. 115 416.
- [9] *Jobbagy A., Kirally K.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1966. V. 124. P. 166.
- [10] *Tengyrtiy R.P., Chang C.A.* // *Anal. Biochem.* 1966. V. 16. P. 377–382.
- [11] *Tehrani Z., Burwell G., Mohd Azmi M.A.* et al. // *2D Materials.* 2014. V. 1. P. 025 004.