



Пятая международная конференция • Школа молодых учёных

# ФИЗИКА — НАУКАМ О ЖИЗНИ

Санкт-Петербург • 16–19 октября • 2023



## Детектирование вирусных инфекций биосенсорами на основе графена

С.П. Лебедев, А.А. Лебедев, С.Ю. Приображенский, Е.А. Гущина,  
И.А. Елисеев, А.В. Нащекин, В.Н. Петров, С.А. Сныткина, Е.М.  
Танклевская, Е.И. Шабунина, Н.М. Шмидт, М.В. Пузык,  
А.С. Усиков, А.Д. Роенков, С.А. Клотченко, А.Н. Васин

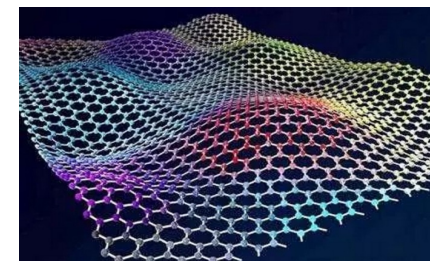


Nitride Crystals Group

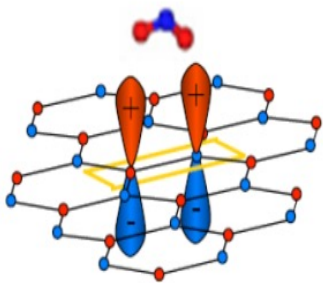
# Сенсорные свойства плёнок графена

## Особенность графена

Отличительной особенностью графена является то, что всякие адсорбируемые на его поверхность молекулы или группы атомов действуют как донор или акцептор, приводя к изменению его электронного состояния (сопротивления), которое можно зарегистрировать.



2D гексагональная сотовая структура графена

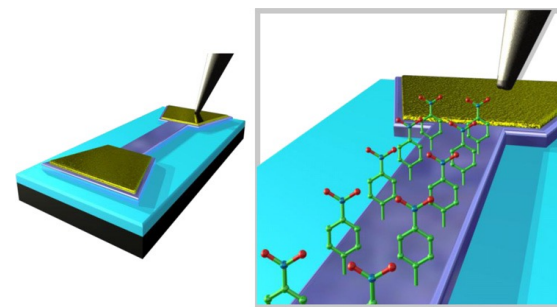


Графен: слабые  $\pi$ -связи на поверхности

## Перспективы графенового биосенсора

Такая специфика пленки графена в принципиальном плане может быть использована при создании биосенсоров для регистрации (диагностики) предельно низких концентраций биомолекул, связанных с различными социально значимыми заболеваниями на ранней стадии (гепатит, онкология, ВИЧ или гемолиз, вирусные заболевания (грипп, коронавирус), болезнь Альцгеймера).

Сама по себе пленка графена не является селективно чувствующим сенсором и может присоединять на свою поверхность разные вещества и биомолекулы. Для использования графена в качестве сенсора применяют специальную обработку, которая повышает избирательность химических реакций на поверхности графена и создает дополнительные ковалентные связи для химических реакций с другими молекулами, которые необходимо детектировать.



Функционализованный (обработанная) поверхность плёнки графена в чипе.

\*Z Tehrani et al., 2D Materials 1 (2014) 025004,  
DOI: <https://doi.org/10.1088/2053-1583/1/2/025004>

# Концепция биосенсора на графене

Защита организма от инфекции – бактериальной, вирусной, грибковой или паразитарной – осуществляется системой иммунитета. Любая макромолекула, чуждая организму (антиген), может вызвать иммунный ответ в виде реакции взаимодействия антиген-антитело (АГ-АТ), приводящей к образованию иммунного комплекса, который препятствует развитию заболевания.

Взаимодействие АГ-АТ селективное и осуществляется по принципу ключ-замок трехмерной пространственной комплементарности наружных электронных облаков родственных молекул антитела и антигена.

*In vitro* данные реакции лежат в основе многих иммунологических методов и широко используются в лабораторной практике.

Разрабатываемая концепция биосенсора основана на создании условий протекания контролируемой реакции АГ-АТ непосредственно на поверхности графена.

Именно эта реакция приводит к мгновенному изменению электронного состояния графена (его сопротивления), которое можно зарегистрировать.

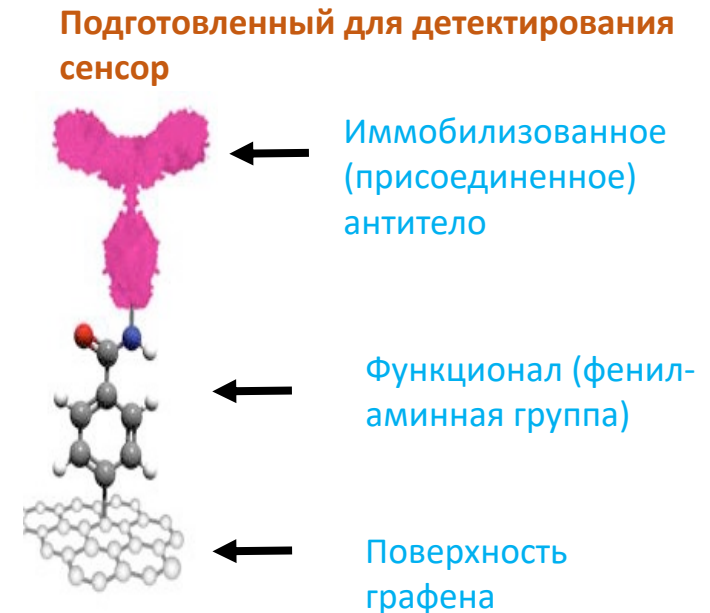
Только комплементарные (родственные) антитела и антигены принимают участие в реакции взаимодействия, чем достигается селективность биосенсора.

\* <https://en.ppt-online.org/657228>;

\*S. Eissa et al., Nano Res., 2015 DOI: 10.1007/s12274-014-0671-0;



ПЦР тест: Kary B. Mullis, Michael Smith.  
1993 Noble Prize in Chemistry

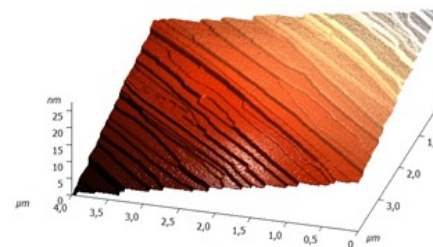
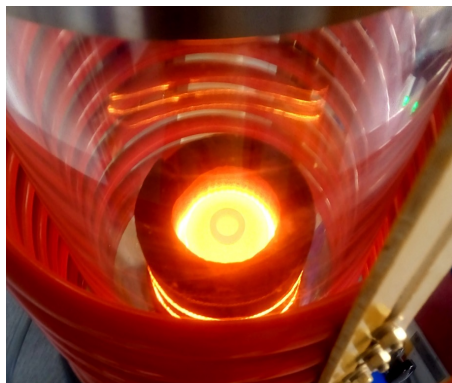


# Рост пленок графена на SiC подложках

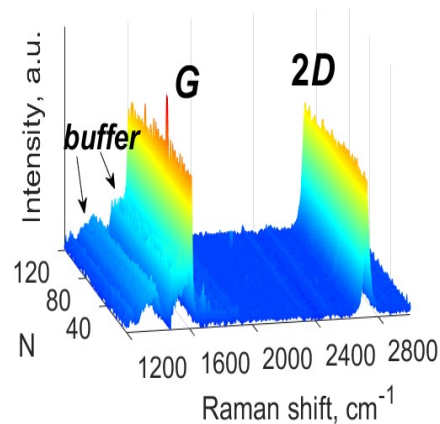
Для роста графена используется метод термического разложения (сублимации) поверхности полупроводящей подложки 4H-SiC (Si-грань) в атмосфере аргона. Рост осуществляется в графитовом тигле с ВЧ нагревом.

## Условия роста:

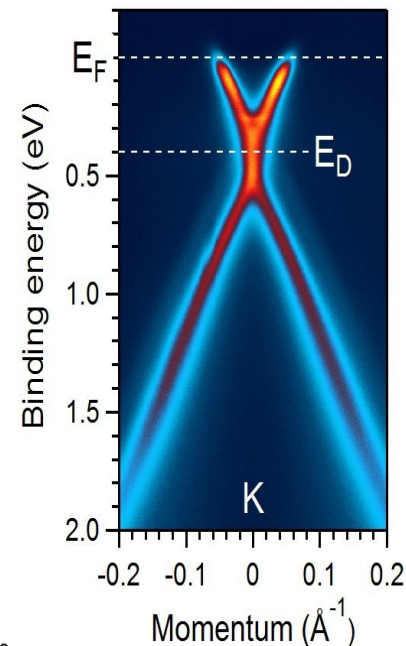
- Температура: 1700 - 1800 °C
- Время роста: 5-10 мин
- Рост в аргоне при 760 Торр



3D-ACM изображения поверхности образцов графен/SiC



Массив спектров комбинационного рассеяния света, подтверждающий присутствие графена на подложке SiC



Данные ФЭСУР о структуре электронной валентной зоны в окрестности точки К зоны Бриллюэна

**Метод позволяет выращивать качественные однослойные пленки графена на подложках**

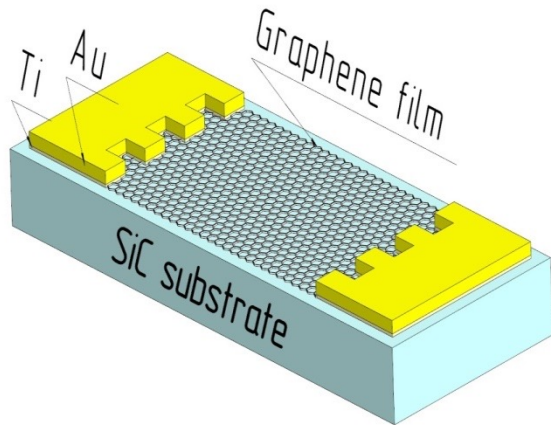
**SiC большой площади, что важно для процессирования чипов для сенсорного применения.**

- V. Yu. Davydov et al., Semiconductors, 2017, Vol. 51, No. 8, pp. 1072–1080,
- \*S.P. Lebedev, et al. Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct., v.28, 4, 2020, с. 1 – 4,

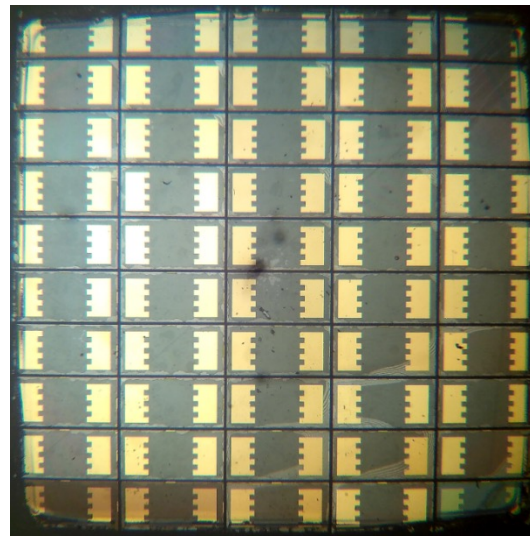
# Процессирование графеновых сенсоров

## Этапы процессирования:

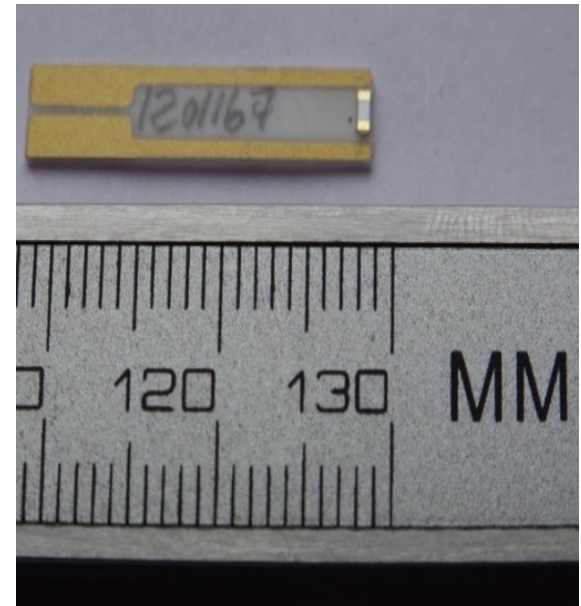
1. Формирование топологии сенсоров на поверхности структуры графен/SiC методом лазерной фотолитографии в сочетании с ионно-реактивным травлением в аргоне и травлением в кислородной плазме.
2. Формирование омических контактов Ti/Au (5 нм/50 нм) вакуумным напылением и взрывной фотолитографией.
3. Резка подложки на отдельные чипы размером 1,5 мм× 2 мм
4. Монтаж чипов на держатель из текстолита или керамики + разварка золотыми проводками.
5. Защита всех токоведущих частей сенсора диэлектрическим лаком.



*Схематическое изображение графенового чипа*



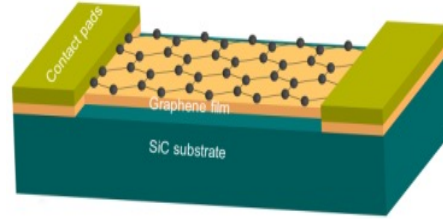
*Структура графен/SiC после процессирования и резки*



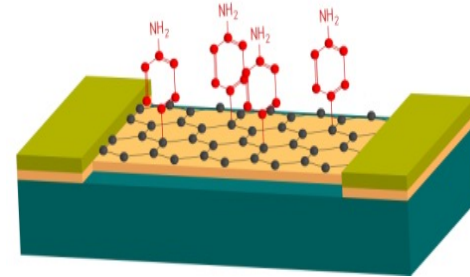
*Внешний вид биосенсора на держателе*

# Подготовка поверхности биосенсора к детектированию

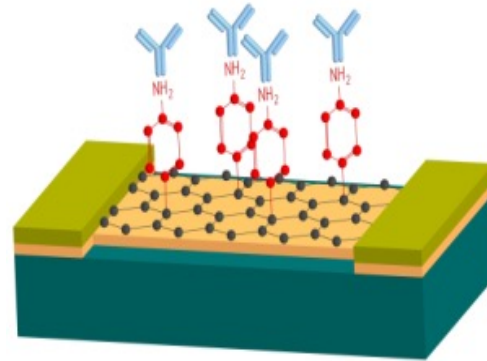
1. Сенсор после процессирования



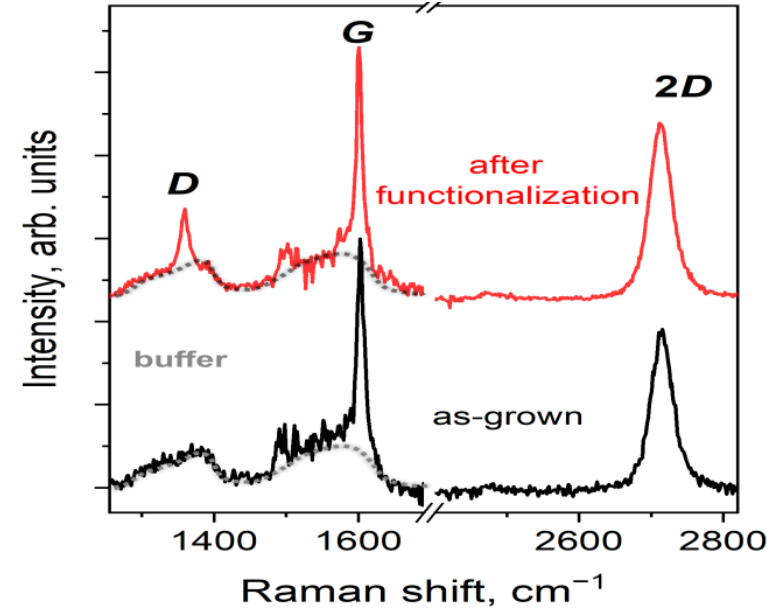
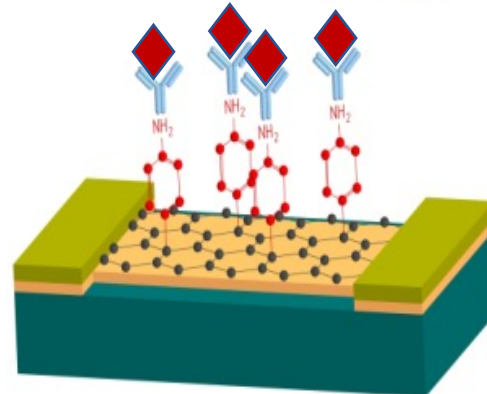
2. Функционализация поверхности графена



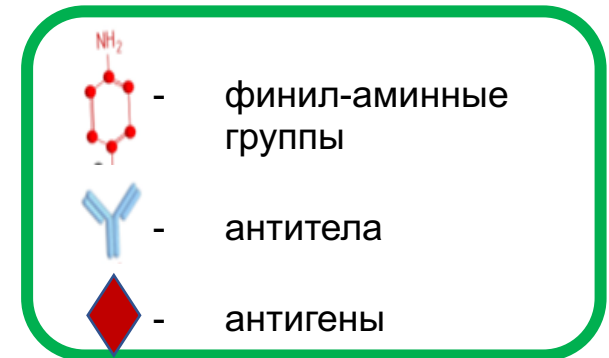
3. Инкубация антител на функционализированной поверхности графена



4. Реакция взаимодействия антиген-антитело

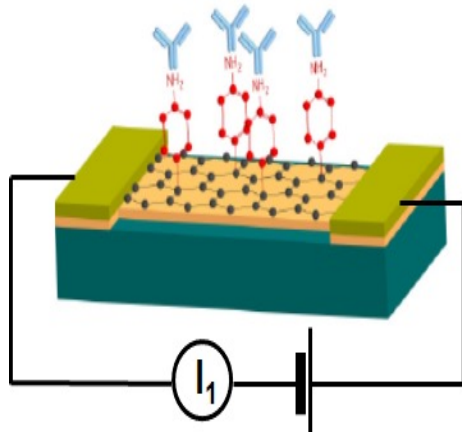


Спектры комбинационного рассеяния света до и после функционализации графена



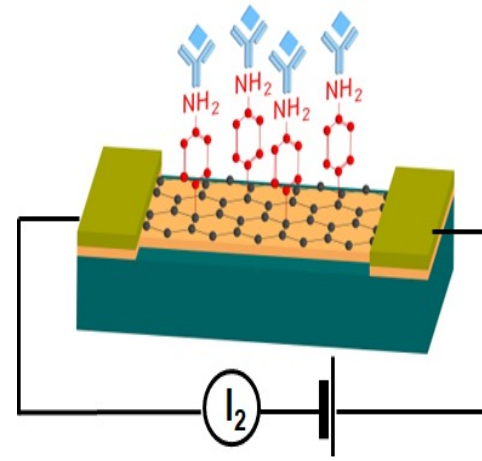
A. Usikov, M. Puzyk, S. Novikov, I. Barash, O. Medvedev, A. Roenkov, A. Goryachkin, S. Lebedev, A. Zubov, Y. Makarov, A. Lebedev «Electrochemical treatment of graphene». Key Eng. Mat., v.799, 2019, с. 197 – 202

# Принцип работы биосенсора на графене



Подготовленный биосенсор с нанесенным антителом

$$I_1 \neq I_2$$



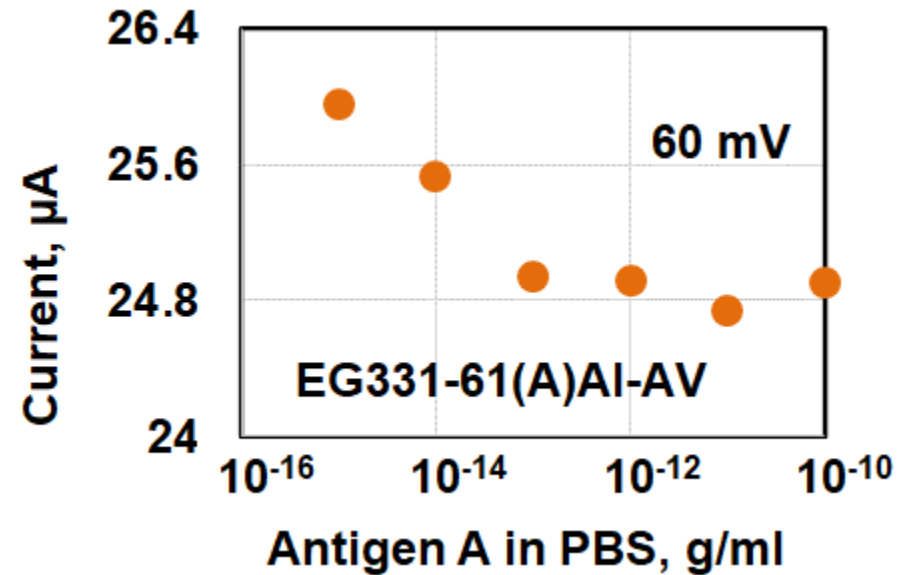
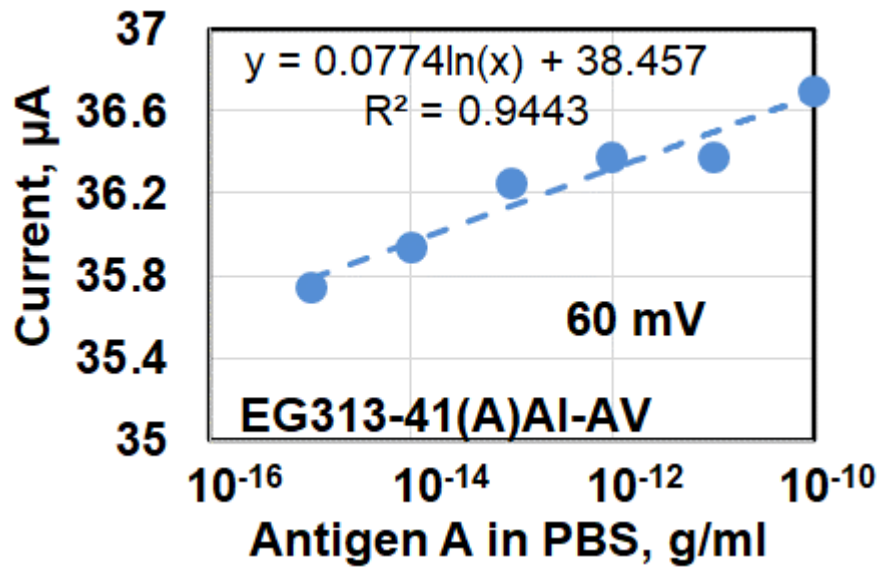
Биосенсор в контакте с детектируемым вирусом (антигеном)

Процесс детектирования основан на химической реакции соединения антигена с комплементарным ему антителом, при котором происходит изменение электронного состояния (сопротивления) графенового канала, которое фиксируется по изменению протекающего тока при подаче стабилизированного напряжения на чип.

В качестве отклика или реакции чипа  $r$  (response) удобно использовать относительное изменение сопротивления чипа  $R$  до и после его контакта с антигеном  $r = (R - R_0) / R_0$ , где  $R_0$  – начальное сопротивление чипа. Иногда в качестве отклика используют изменение тока через чип или его сопротивление.

Отклика чипа не наблюдается или он незначителен, если антиген не является родственным к антителу. Этим достигается селективность реакции биосенсора.

# Первые эксперименты: детектирование вирусов гриппа А



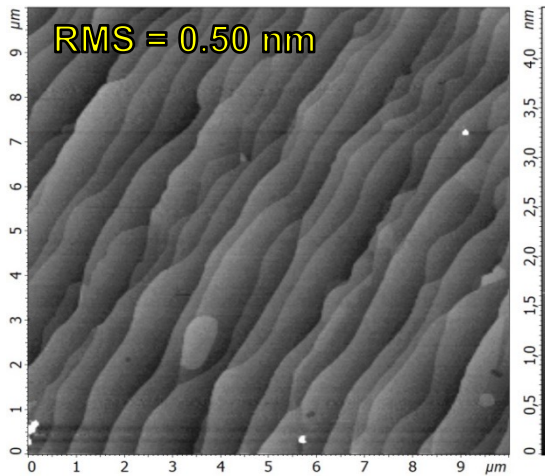
Отклик графенового биосенсора в зависимости от концентрации антигена вируса гриппа А в растворе PBS. Пунктирная линия представляет аппроксимацию данных логарифмической функцией с параметром  $R^2=0,96$ .

Эксперименты по детектированию вирусов гриппа чипами на основе пленок графена на подложках SiC показали работоспособность концепции биосенсора, основанной на реакции специфического связывания антитела с комплементарным ему антигеном непосредственно на поверхности графена. Продемонстрирована высокая чувствительность подобных сенсоров с использованием низких концентраций антигенов вирусов гриппа А вплоть до  $10^{-15}$  g/ml (1 fg/ml).

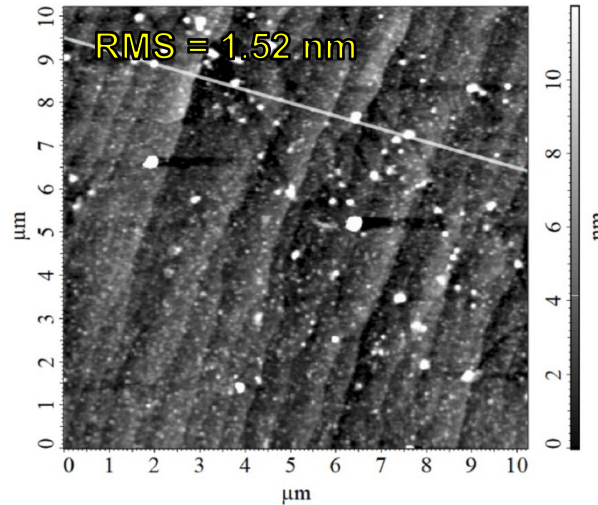
\*Lebedev, A.A.; Davydov, S.Y.; Eliseyev, I.A.; Roenkov, A.D.; Avdeev, O.; Lebedev, S.P.; Makarov, Y.; Puzuk, M.; Klotchenko, S.; Usikov, A.S. Materials 2021, 14, 590. <https://doi.org/10.3390/ma14030590>



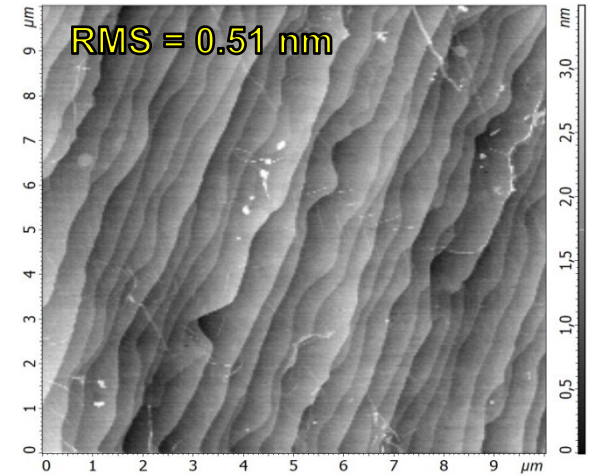
# Влияние дополнительной очистки поверхности графена в чипе



АСМ изображение исходной поверхности структуры графен/SiC.



АСМ изображение поверхности с остатками фоторезиста после процессирования.

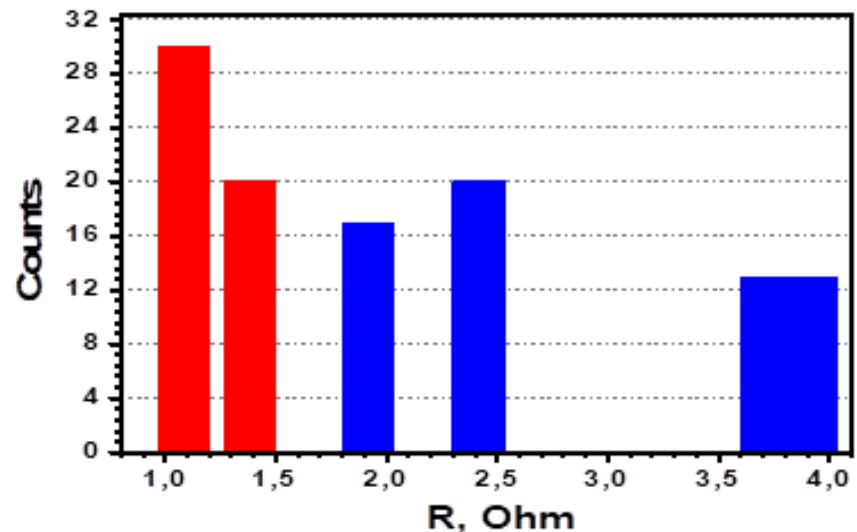


АСМ изображение поверхности после дополнительной очистки от фоторезиста.

Гистограмма распределения значений сопротивления чипов биосенсоров на подложке

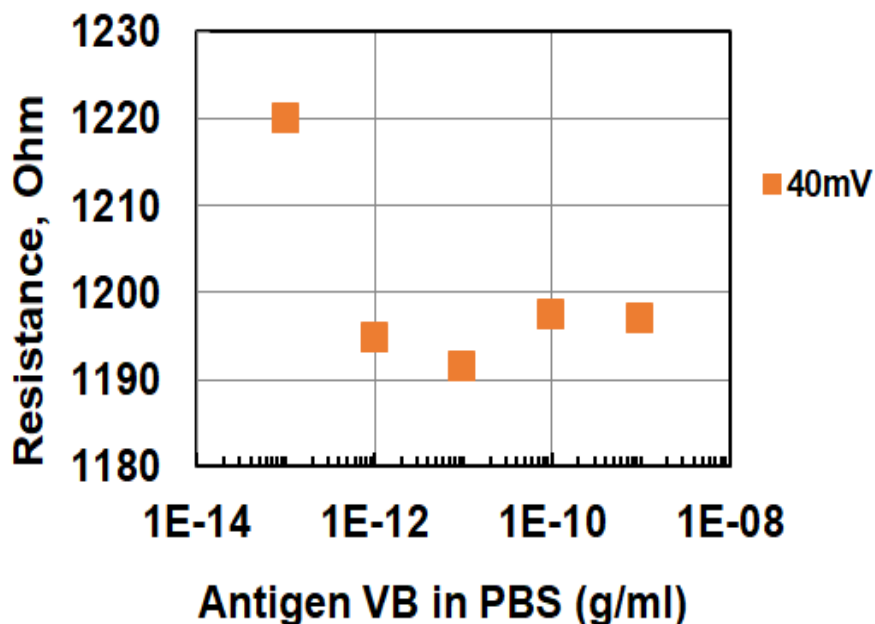
- с остатками фоторезиста
- после дополнительной очистки

Общее количество чипов, изготовленных из каждой пластины, 50 штук.

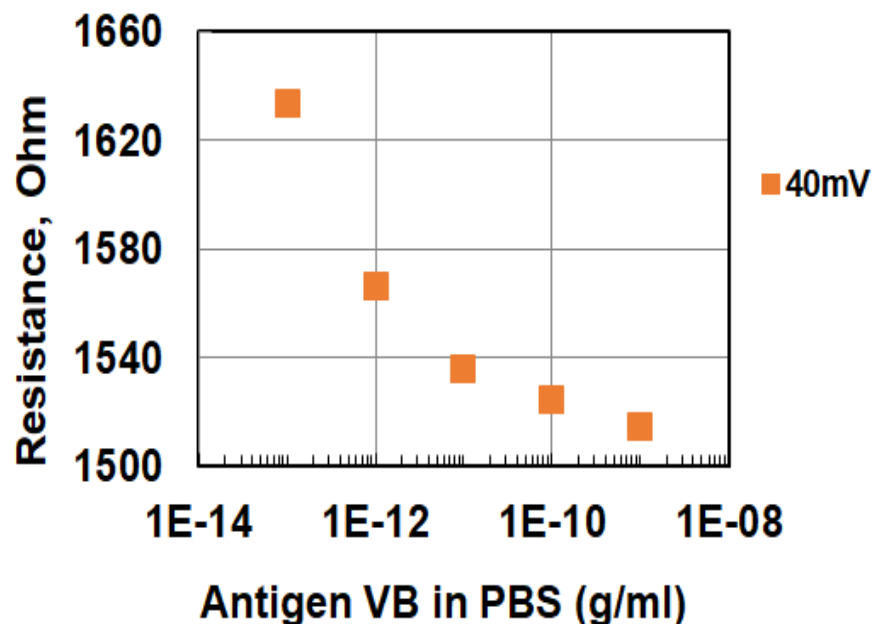


# Сравнение отклика сенсоров до и после очистки поверхности графена

Отклик сенсора с остатками фоторезиста после процессирования.



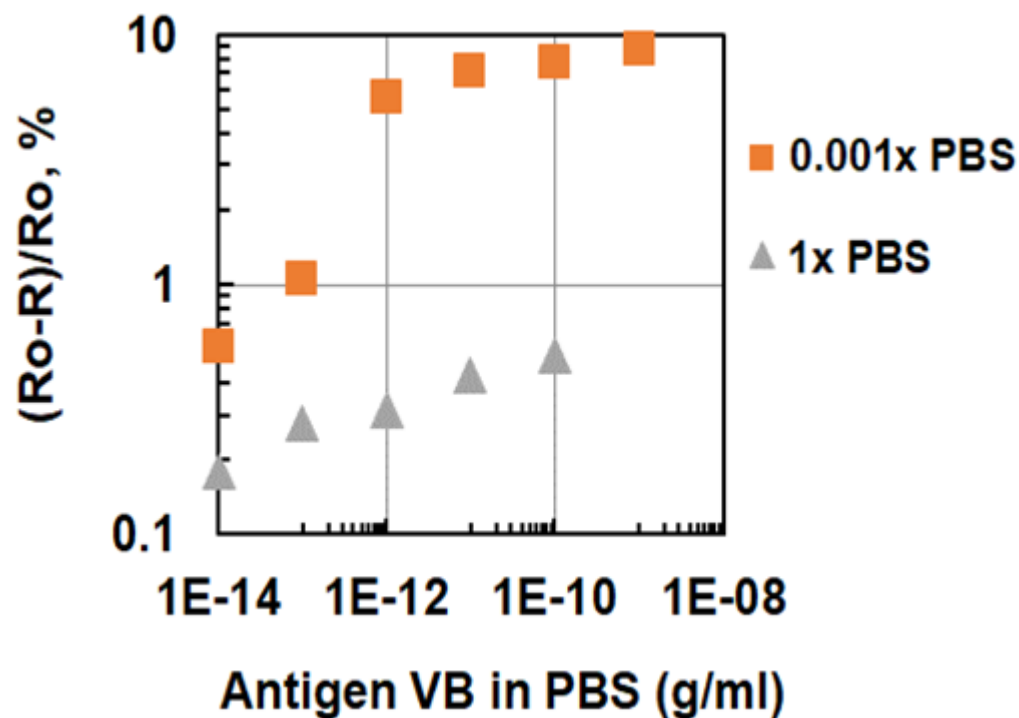
Отклик сенсора с дополнительной очисткой от фоторезиста.



Наблюдается увеличение чувствительности чипа после дополнительной очистки поверхности графена. Сопротивление чипа во всем диапазоне концентраций антигенов вируса гриппа В изменилось на 120 Ом.

В чипе с остатками фоторезиста изменение сопротивления было всего 30 Ом. В 4 раза меньше.

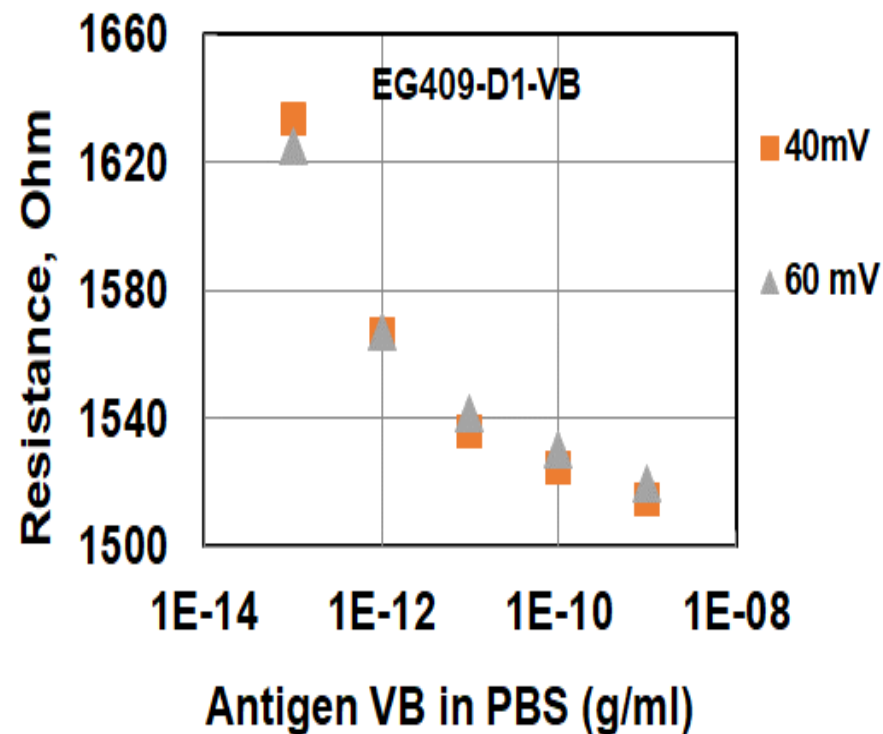
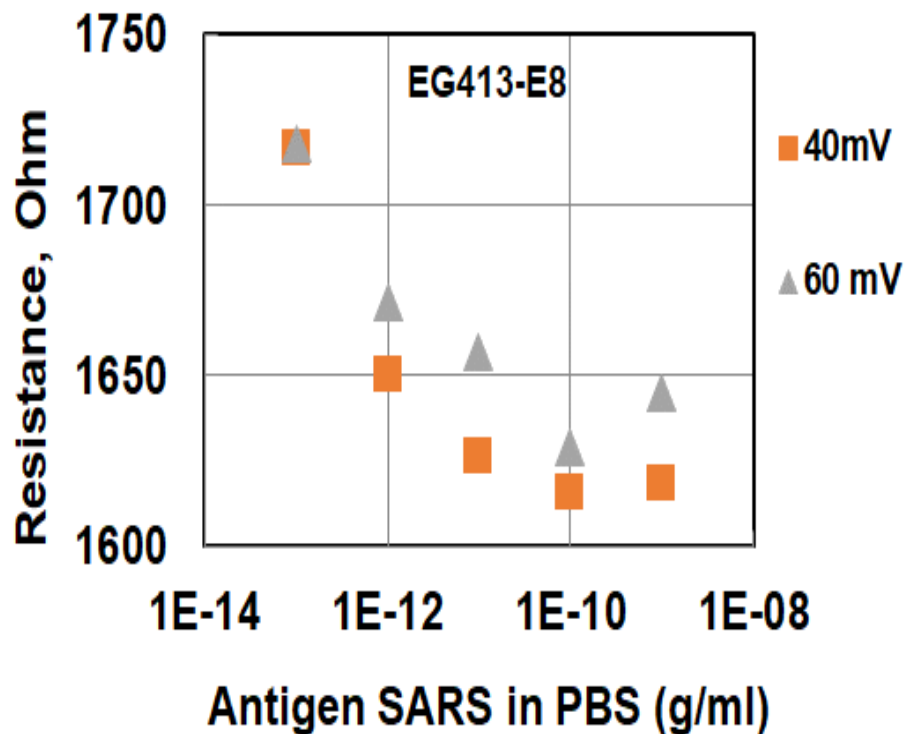
# Влияние разбавления растворов PBS на чувствительность графеновых биосенсоров



Отклик графенового сенсора ( $R-R_0/R_0$ ) в разбавленных растворах фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) оказался в несколько раз выше, чем в неразбавленных растворах PBS. Использование анализируемого вещества (вирус гриппа B) в разведенном в 1000 раз растворе PBS позволило повысить чувствительность биосенсоров в диапазоне концентраций анализируемого вещества  $10^{-14}$  -  $10^{-9}$  г/мл.

Использование разбавленного раствора PBS для обнаружения вирусов может оказаться многообещающим для повышения чувствительности графенового биосенсора. Разбавление снижает ионную силу раствора PBS, что уменьшает влияние радиуса экранирования Дебая в ионных растворах на чувствительность биосенсора.

# Детектирование коронавируса и вируса гриппа В биосенсорами на основе графена



Изменение сопротивления чипов при контакте с растворами коронавируса SARS и вируса гриппа В (VB) при постоянном напряжении на чипе 40 mV и 60 mV.

# Заключение

В результате проведенной работы:

- Показана перспективность применения биосенсоров на основе структуры графен/SiC для детектирования вирусных инфекций
- Выявлены способы улучшения воспроизводимости результатов и чувствительности сенсоров.

Направления развития исследований по детектированию вирусных инфекций биосенсорами на основе графена:

1. Увеличение площади структур графен/SiC для увеличения количества чипов за один цикл процессирования
2. Поиск оптимальных способов защиты поверхности графена перед процессированием
3. Поиск оптимальных способов подготовки растворов вирусных инфекций для проведения детектирования
4. Проведение экспериментов по детектированию с живыми вирусами.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Минобрнауки № 075-15-2021-1349.

Спасибо за  
внимание!