

Электронные биохимические наносенсоры для клинических исследований (Обзорная статья)



В. П. Попов,
д. ф.-м. н., зав.
лабораторией ИФП СО
РАН, г. Новосибирск
e-mail: popov@isp.nsc.ru



А. В. Тронин,
директор
ЗАО «Медико-
биологический
Союз–Технология»



А. В. Глухов,
зам. ген. директора
ОАО «НЗПП с ОКБ»,
г. Новосибирск



Ю. Д. Иванов,
д. б. н., зав.
лабораторией ИБМХ
РАМН, г. Москва

Представлен обзор принципиальных решений для формирования устройств иммунодиагностики с использованием электронных компонентов — биохимических наносенсоров зарубежных авторов и авторов статьи. Обоснована перспектива применения биосенсоров для построения современных диагностических устройств. Проведен анализ зарубежного и отечественного рынка.

Ключевые слова: устройства для иммунодиагностики, наносенсоры, биохимические наносенсоры, РОС-системы.

Введение

В настоящее время за рубежом активно развиваются методы экспресс-диагностики и мониторинга состояния человека с помощью приборных и бесприборных тестов, которые позволяют получить результат анализа в течение нескольких минут. Существуют решения по экспресс-диагностике состояния человека, его кардио-, иммунной систем, присутствия инфекций: они могут применяться в службе скорой помощи, при госпитализации, в домашних условиях.

Среди устройств диагностики особое место занимают биохимические сенсоры.

Целью настоящей работы является обзор зарубежных и отечественных разработок по биохимическим сенсорам экспресс диагностики состояния человека на основе электронных компонентов наноразмеров.

1. Направления развития электронных биохимических сенсоров

Ранняя диагностика заболеваний и инфекций представляется одним из наиболее перспективных направлений современной медицины. Ряд компаний уже поставляют на фармацевтический рынок тестовые наборы. Причем стоимость такого анализа в разы дешевле, чем нынешние лабораторные исследования.

Так, STADA Arzneimittel AG совместно с немецкой фармакологической компанией Mechacare выпускает тесты для определения менопаузы (чувствительны к повышенной концентрации фолликулостимулирующего гормона в моче), на содержание железа (по анализу крови), тест на наличие антител к бактерии *Helicobacter pylori*, вызывающей развитие язвы желудка, тест на выявление крови в кале (показывает внутреннее кровотечение), тест на определение непереносимости глютена и другие (ЗАО МБС). Наличие этих простых в использовании инструментов делает реальной существование point-of-care (РОС) лабораторной диагностики, о которой так много говорят и которую давно ожидают медики и пациенты.

Подобные биосенсоры смогут работать не только с жидкостями, но и с аналитами в газовой среде, распознавая молекулы вредных веществ в концентрациях на уровне единичных частиц. Это ляжет в основу новых приборов, контролирующих состояние окружающей среды, или детекторов большинства видов токсичных или взрывчатых веществ. В роли таких детекторов (датчиков, сенсоров), действующих в газах и биожидкостях, вполне вероятно будут выступать кремниевые нанопроволочные транзисторы. Начало исследованиям полупроводниковых нанопроволочных транзисторов положил в 1990-х гг. профессор химии Гарвардского университета доктор Чарльз Либер. В то

время у исследователей возник интерес к углеродным нанотрубкам. Было показано, что их электронные свойства существенно изменяются даже при контакте с одиночными биологическими молекулами. Это означало, что подобные наноструктуры можно будет использовать в качестве крайне чувствительных биосенсоров.

Несмотря на то, что технология выращивания нанотрубок сегодня уже относительно хорошо освоена, упорядочивать углеродные нанотрубки на поверхности чипа по-прежнему пока сложно. Исследователи из Гарварда в начале века обратили внимание на кремниевые нанопроволоки, которые проще выращивать в заданных местах, а формой и свойствами которых гораздо легче управлять в рамках стандартных технологических процессов эпитаксии. Так появились первые кремниевые нанопроволочные транзисторы. В России к работе с нанопроволочными транзисторами приступили также в начале 2000-х гг., когда по инициативе академика Жореса Алферова исследователи из ИФП СО РАН включились в проект создания нанопроволочных транзисторов на основе гетероструктур кремния на изоляторе (КНИ), создавая нанопроволоки как с помощью эпитаксиального роста на наночастицах-катализаторах [1, 2], так и путем электронно-литографического структурирования ультра тонких сплошных пленок кремния, перенесенных на изолятор методом водородного скальвания [3]. Если для первого способа пока не решены проблемы роста нанопроволок без дефектов структуры и электрически активных включений материала, служащего катализатором эпитаксиального роста, а также встраивания нанопроволок в интегральную схему электронного биочипа, то для второго возможно применение стандартных методов кремниевой микроэлектроники, обеспечивающих массовое производство и высокие экономические показатели.

Электронный биочип представляет собой комплекс обычных микросхем, в них есть небольшое отверстие, куда поступает биожидкость — раствор с частицами, которые нужно проанализировать. А дальше срабатывают методы электрохимии и биологии. Предварительно на поверхность нанопроволочного элемента сенсора наносятся антитела, например, к вирусу гриппа, к маркерам некоторых видов опухолей, инфаркта миокарда, или иных заболеваний. Антитела реагируют только с определенными антигенами. Это взаимодействие, называемое аффинным, очень сильное и способно изменить электронные свойства частиц, являющихся по сути затворами транзистора. В результате при соединении двух больших биологических молекул — антигена и антитела — меняются соответствующие поверхностные потенциалы. Тогда вступает в действие полевой транзистор, который регистрирует изменение этих потенциалов увеличением или уменьшением протекающего по нему тока. Аналогичным образом действуют и оптические биосенсоры. Они регистрируют маркеры гепатита В и С. При образовании комплексов антител с маркерами в оптическом биосенсоре увеличивается коэффициент преломления, луч лазера поворачивается на определенный угол, и детектор сигнализирует о присутствии в

крови маркерных белков. Но для оптических методов требуются покрытия, близкие к монослойным, т. е. существенно большая концентрация маркеров, чем для электронных биочипов, способных регистрировать единичные заряды. Кроме того, нами показано, что вместо дорогостоящих антител могут с успехом применяться более дешевые синтетические аптамеры, обладающие более слабым взаимодействием с антигенами по сравнению с антителами, но обеспечивающие большую чувствительность биосенсора за счет меньших размеров и более сильного изменения потенциала на поверхности нанотранзистора.

Тот же принцип используется и при регистрации нанотранзисторами определенных молекул в газах. Достаточно найти взаимодействующие с ними вещества — и можно делать на основе кремниевых нанопроволочных сенсоров очень чувствительные и дешевые датчики. Применение их многообразно, например — в системах безопасности в публичных местах, поскольку такие сенсоры могут избирательно, точно и достаточно быстро (секунды в воздушном потоке) реагировать и на взрывчатые вещества. Так как подобные сенсоры регистрируют изменение потенциала, понятно, что они могут использоваться, например, как для снятия энцефалограмм, так и для определения карты активности отдельных нейронов, поскольку в коре головного мозга также постоянно изменяются электрические потенциалы, которые можно фиксировать этими био-датчиками, а их нанометровые размеры обеспечивают беспрецедентное пространственное и временное разрешение, и возможность функционирования даже внутри живой клетки без ее заметных повреждений.

Важно также, что принцип работы полевого транзистора полностью совпадает с принципом работы клеточной мембраны, где перепад потенциалов определяет ее проницаемость для регулирующих ионов и питательных веществ. В ближайшей перспективе наиболее обширной нишей применения подобных сенсоров останется область лабораторной диагностики, в том числе с возможностью индивидуального применения.

2. Устройства для иммунодиагностики по месту лечения (point-of-care). Обзор рынка

Сегмент point-of-care (POC) лабораторной диагностики (диагностики по месту лечения больного) занимает значительную часть мировой индустрии лабораторной диагностики и обладает большим потенциалом роста. Наиболее значимые сегодня POC-тесты на рынке — это тесты на глюкозу, уровень гемоглобина, газы крови, беременность, фертильность. Перспективы развития данного сегмента зависят в первую очередь от появления на рынке приборов для POC-диагностики в виде небольших устройств, как правило, настольных или носимых, которые позволяют максимально автоматизировано и надежно провести процедуру анализа, передать данные в сеть и получить результат.

Под персонализированной или Point-of-care (POC) — диагностикой обычно понимают экспресс-тесты, или тесты, выполняющиеся с помощью пор-

Таблица 1
Объемы продаж РОС-диагностики, 2007 г.

| Регион | Объем продаж, \$ млн |
|---------------|----------------------|
| США | 1311 |
| Европа | 835 |
| Азия | 120 |
| Остальной мир | 120 |
| Итого | 2385 |

тативных устройств прямо в приемной доктора/больницы, у постели больного или в домашних условиях, и не требующие для своего выполнения высококвалифицированного персонала и сложной инфраструктуры клинической лаборатории. Мировой рынок РОС-диагностики занимает 15% рынка всей лабораторной диагностики и является его самым быстрорастущим (ежегодный прирост составляет 15%) сегментом. В 2007 г. он оценивался в \$2,385 млрд, (исключая тесты для определения глюкозы, их объем продаж составляет \$2,5 млрд в год). Географическое распределение представлено в табл. 1.

Наиболее перспективным целевым рыночным сегментом рынка РОС-диагностики представляется сегмент тестов для профессионального использования (в офисе доктора, клиниках и т. д.). Наиболее популярные продукты этого сегмента включают тесты на глюкозу, протромбиновое время, анализ мочи. Сюда также входят экспресс-тесты, применяемые в больницах: наиболее популярными продуктами в этом сегменте являются тесты на наркотики, газы крови и электролиты, глюкозу, скрытую в кале кровь, кардио-маркеры, тесты на беременность и на инфекционные заболевания. Объем продаж разных продуктовых групп в сегменте представлен в табл. 2.

Объем продаж в описываемом сегменте в 2007 г. составил \$1,625 млрд, его темп роста составил 14% в год. В Европе рост продаж был обеспечен появлением простых и автоматизированных устройств для клинической химии (анализ мочи, глюкоза, протромбиновое время), которые позволяют провести анализ в условиях приемной врача. Начиная с 2007 г. данное направление начало активно развиваться в Штатах, после того, как были сняты некоторые регуляторные ограничения. По экспертным оценкам в США примерно 200 тыс. приемных врачей и клиник являются потенциальными покупателями РОС-устройств.

По данным [Kalorama Information Report], наиболее часто упоминаемая причина ограниченного развития РОС-иммунодиагностики — это технологический барьер. Большинство неавтоматизированных иммунодиагностических экспресс-тестов основаны на качественной хроматографической технике с визуальной детекцией результатов, которая не позволяет добиться достаточного уровня достоверности результатов анализа, его чувствительности и специфичности, а также накладывает проблемы с документированием его результатов. Разработка РОС-устройств для иммунодиагностики нацелена на решение именно этих задач.

Для персонализированной медицины рынок гораздо больше. Хорошо известно, как быстро могут

Таблица 2
Объемы продаж в сегменте для профессионального использования, 2007 г.

| Продуктовая группа | Объем продаж, \$ млн |
|----------------------|----------------------|
| Беременность | 110 |
| Кардиомаркеры | 425 |
| Холестерин/липиды | 250 |
| Гемоглобин | 300 |
| Скрытая кровь в кале | 290 |
| Онкомаркеры | 120 |
| Наркотики | 110 |
| Прочие | 20 |
| Итого | 1625 |

распространяться инфекционные заболевания, — а значит, должны существовать и быть максимально доступными индивидуальные оперативные способы детектирования инфекций буквально в полевых условиях, что критично в борьбе с эпидемиями. К сожалению, сегодняшние методы тестирования требуют часов, а иногда и дней, а также зачастую специального, дорогого и абсолютно немобильного оборудования. Но исследователи уже нашли способы кардинального решения этой проблемы.

Сегодня, помимо РОС-устройств для определения уровня глюкозы, портативные биохимические анализаторы прочно вошли в медицинскую практику, хотя проблема автоматизации иммунодиагностических исследований в формате мобильных сетевых РОС-устройств еще не решена. Дело в том, что иммунодиагностические исследования включают в себя очень широкий спектр анализов (маркеры инфекционных заболеваний, аллергии, онкомаркеры, гормоны, кардиомаркеры и т. д.). Поэтому иммунодиагностические РОС-тесты присутствуют на рынке пока только в формате экспресс-полосок (в частности для диагностики ВИЧ, вирусных гепатитов, сифилиса), которые имеют недостаточную чувствительность и специфичность, что сильно ограничивает области их применения. Компании, работающие в сегменте лабораторной диагностики, регулярно предпринимают попытки создания и вывода на рынок устройств для персональной РОС-иммунодиагностики, но пока ни одно из них не вошло широко в медицинскую практику из-за их технической сложности, низкой надежности и/или высокой стоимости.

3. Примеры разработанных устройств РОС-иммунодиагностики

В настоящее время наиболее развит сегмент экстренной медицинской помощи («emergency diagnostics»). Устройства для иммунодиагностики, применяемые в службе экстренной помощи, предназначены в первую очередь для определения кардиомаркеров — определения риска инфаркта миокарда (тропонин Т, миоглобин, СК-МВ, Д-димер, Натрийуретический гормон). Мировые лидеры Abbott, Roche организовали активные продажи таких устройств и картриджей к ним во всех странах, в том числе и в России (рис. 1, табл. 3). Альянс bioMerie совместно с



Рис. 1. Внешний вид устройств Cobas h 232 system (Roche), i-Stat (Abbott), FastPack (Qualigen)

Philips объявил о выводе на рынок подобного устройства в ближайшие годы.

В дальнейшем также возможно развитие этого направления для домашнего использования. Проблема выхода в этот сегмент заключается в интерпретации результатов тестов, которая требует наличия специальных знаний и комплексного подхода (анализа результатов других тестов, изучение анамнеза и симптоматики и т. д.) и может быть сделана только врачом. Поэтому внедрение РОС-устройств в этом сегменте может быть осуществлено как элемент дистанционной системы мониторинга за состоянием пациента, с передачей данных в электронном виде лечащему врачу. Сейчас это направление развивается и внедряется для таких простейших медицинских показателей как артериальное давление, сахар крови, газы крови и т. д. Для этих целей ведущими фирмами (Texas Instrument, Freescale, ST Microelectronics) выпускаются наборы интегральных схем (ИС), предназначенных для сетевого обмена по защищенному медицинскому протоколу IEEE 11073-20601.

Сегмент «physician office labs» рассчитан на маленькие лаборатории прямо в приемной врача и небольшие клиники. Развитие этого сегмента идет медленными, но устойчивыми темпами. Ряд компаний распространяет устройства для иммунодиагностики для этого сегмента, но линейка тестов от отдельного производителя, как правило, нацелена на какую-то узкую область, чаще всего гормоны и онкомаркеры. Проблемы при выходе в данный сегмент обусловлены необходимостью иметь широкую сеть распространения, продаж и обслуживания устройств, а также высокими требованиями к набору в линейке тестов и к аналитическим характеристикам анализов.

Многие исследовательские группы из лабораторий и университетов США и Европы вовлечены в разработки новых подобных устройств. Так, Джейн Ву, сотрудница кафедры теории вычислительных машин и систем и электрического инжиниринга Университета штата Теннесси (США), и ее коллеги разработали портативный прибор с электроосмотической микрожидкостной ячейкой, который может быть использован «в полевых условиях» для детектирования инфекционных заболеваний и патогенов. Применение этого устройства доступно любому медику где угодно и при любых обстоятельствах. Все что нужно это капля крови, помещенная на микрочип внутри прибора.

Разработанный в этой работе способ показывает возможность создания матрицы нанопроволочных сенсоров с ограниченным набором антител, а универ-

сальность сенсора может быть достигнута применением специальных буферных растворов, активирующих соответствующие антигены в присутствии молекул аналита. Подобный подход перспективен для замены дорогих в производстве комбинаций антиген-антитело, или для регистрации химически активных молекул и токсинов. Замена антител синтетическими аптамерами была успешно продемонстрирована в нашей работе с анализом антигена D-NFAT1, опубликованной в журнале «Биомедицинская химия». В ней показано, что использование КНИ-нанопроволочного аптасенсора с шириной нанопроволоки 90 нм, позволяет достичь чувствительность регистрации белка D-NFAT 1 (признак высокоагрессивного рака легких) на уровне менее 10^{-15} М в режиме реального времени (рис. 2).

Концентрация ионов в крови или в плазме составляет $I.S.=0,15$ М, а в стандартных буферных растворах, используемых при анализе, она должна быть в диапазоне всего от 10 до 10^4 М в зависимости от содержания аналита. Необходимость растворения пробы в буферном растворе требует использования сложных микрофлюидных систем. Но как было показано исследователями из Мичиганского университета (University of Michigan, Ann Arbor) [4] преодолеть экранирующий эффект действия ионов и проводить измерения, например ковалентного связывания биотин — стрептавидин при низкой концентрации последнего с помощью нанопроволочных биосенсоров непосредственно в крови можно, если измерять ответ на высокой частоте (~ 10 МГц), когда ионы в растворе не успевают за изменением поля, а дипольный момент комплекса успевает реагировать на внешнее поле, хотя и с фазовым сдвигом, что легко определяется методами импедансометрии. Существенно, что при измерениях на переменном сигнале нет зависимости ответа сенсора от концентрации ионов в растворе, тогда как для постоянного поля такая зависимость логарифмическая, что быстро снижает чувствительность в плазме крови. Уникальный рост чувствительности обеспечивает комбинация нанопроволочного транзистора и МЕМС структуры в виде гибкой мембраны, находящейся в неустойчивом равновесии вблизи него [5]. Захват молекулы аналита на мембрану вызывает ее сближение с нанопроволокой и экспоненциальный рост сигнала от молекулы аналита. По мнению авторов из университета Пердью, чувствительность подобной конструкции на несколько порядков выше, чем у всех известных на сегодня биосенсоров (рис. 3).

Необходимость создания нанопор и измерения пикоамперных токов затрудняет использование электронного биосенсора при геномном анализе ДНК пациента. Авторы работы [5] решили эту непростую задачу, присоединив к порину ДНК-полимеразу фага (бактериального вируса) F29 — генетического паразита бактерий *Bacillus subtilis*. Этот компонент, работая как мотор, обеспечил равномерное и с нужной скоростью протягивание молекулы ДНК через канал полимеразы, служащей каналом транзистора, а истоком и стоком транзистора являются антитела Fc антигена IgG, адсорбированные на двух золотых нанопроволоках, разделенных 10 нм зазором. Затвором транзистора являются олигонуклеотиды, плавающие

Сводная таблица РОС-устройств для иммунодиагностики

| Способ детекции | Время анализа | Чувствительность | Объем и вид образца | Выявляемые аналиты | Вид кюветы | Конт роли | Предварительная подготовка | Стоимость теста |
|--|---------------|-------------------|-------------------------------------|--|-------------------------|-----------------------|----------------------------|---|
| FastPack® IP System | | | | | | | | |
| Хемилюминесценция с использованием парамагнитных частиц | 11 минут | 40 пг/мл | Сыворотка или кровь | гормоны, онкомаркеры | | | | 20–30\$ |
| Stratus® CS Acute Care™ Diagnostic System | | | | | | | | |
| | 14 минут | 30 пг/мл | 3,0 мл сыворотка или кровь | Кардиомакеры | | | Не требуется | |
| cobas h 232 system | | | | | | | | |
| иммунохроматография | 8–12 минут | 30 пг/мл | 50 мкл гепаринизированной крови | Кардиомакеры | тест-полоска | внутренний контроль | Не требуется | 177000 руб |
| Philips magnotech | | | | | | | | |
| флуоресценция с использованием магнитных частиц | 5 минут | 1 pM | 10 мкл, плазма или слюнная жидкость | кардиомакеры | заменяемый картридж | | Не требуется | |
| Abbott i-Stat | | | | | | | | |
| амперометрический/потенциометрический сенсор | | 15 пг/мл | 2-3 капли, кровь или плазма | Электролиты, газы крови, кардиомакеры, химический состав крови, гематокрит | Заменяемый картридж | | | от 5 до 25 фунтов, анализатор 4500-6500\$ |
| Triage® BNP Test | | | | | | | | |
| Хемилюминесценция | 15 минут | 100 пг/мл | Кровь или плазма | кардиомакеры | Заменяемая тест-полоска | Внутренний контроль | | |
| Minion AS100 Analyzer | | | | | | | | |
| Иммунохроматографический анализ конъюгатколлоидного золота | 4 минуты | | 1,5-15 мкл, кровь, плазма или моча | Параметры крови, С-реактивный белок | Заменяемый картридж | | | |
| Vivacta | | | | | | | | |
| Пьезоэлектрический детектор | 5 минут | примерно 50 пг/мл | 30 мкл, кровь | Кардиомакеры, гормоны | Заменяемый картридж | | | |
| RAMP Cardiac Marker System | | | | | | | | |
| Fluorescence/Lateral flow | | 200 пг/мл | | Кардиомакеры | | Не требует калибровки | Не требуется | |
| Cardiac Reader System | | | | | | | | |
| Флуоресценция | 8–12 минут | 100 пг/мл | 150 мкл, кровь | Кардиомакеры | Заменяемая тест-полоска | Не требует калибровки | Не требуется | Стоимость 10 тестов 7000–15000 руб |
| EASY READER | | | | | | | | |
| иммунохроматография | | | | кардиомакеры, гормоны | заменяемая тест-полоска | | | 91600 руб, стоимость теста 3000–4000 руб |
| Triage MeterPro (Biosite, США) | | | | | | | | |
| Флуоресценция | 15 минут | | | Кардиомакеры | заменяемая тест-полоска | | Не требуется | 195000 руб, стоимость 25 тестов 20000–30000 руб |

в буферном растворе и обеспечивающие продвижение цепочки ДНК через отверстие в молекуле Ф-29 при совпадении последовательности оснований в олигонуклеотиде и протягиваемом отрезке ДНК. В процессе движения ДНК изменяется проводимость канала, причем изменение величины тока точно соответствует типу основания ДНК. Это позволяет последовательно измерять записанную в ДНК информацию с высокой точностью. Случайное движение олигонуклеотидов вблизи молекулы Ф-29 может быть заменено на на-

правленный дрейф при управлении потенциалом молекулы со стороны затвора подложки. Эти изменения тока позволяют успешно определять нуклеотидную последовательность ДНК, причем намного быстрее, чем в применяемых ныне методах секвенирования. Работа американских исследователей открывает перспективы определения мутаций ДНК в реальном времени при конкретных заболеваниях, что многократно ускорит и увеличит возможности генной инженерии — от создания совершенно новых, не существующих в

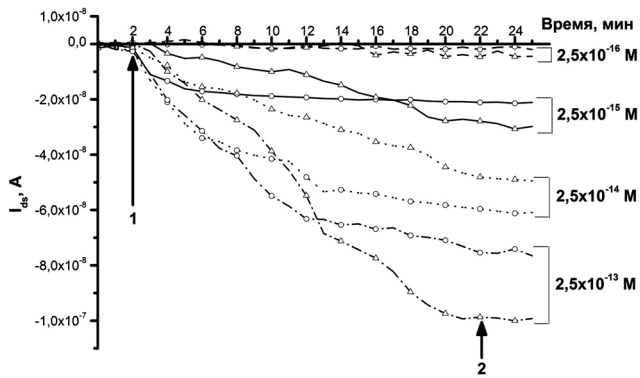


Рис. 2. Зависимость $\Delta I_{ds}(t)$ при биоспецифической детекции D-NFAT 1с помощью НП, с иммобилизованными антителами или аптамерами, соответственно, маркеры (о) или (Δ). Справа указаны концентрация D-NFAT1 в анализируемом растворе, М. Стрелками указано (1) добавление раствора белка и (2) добавление отмывочного буфера

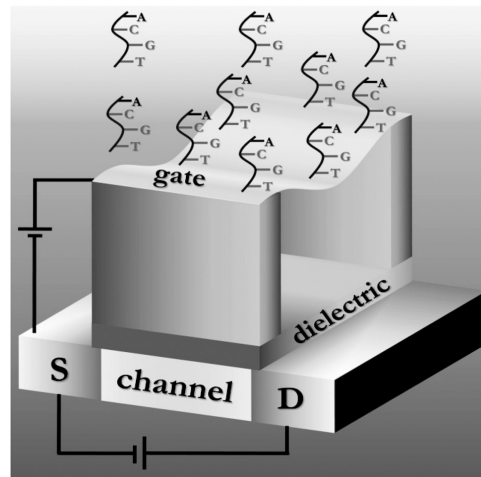


Рис. 3. Схематическое изображение электронного биосенсора с подвижной мембраной в качестве затвора полевого транзистора. (Download image Purdue University image) [по материалам Американского химического общества]

природе видов до полного излечения наследственных заболеваний.

Кроме того, разработанный ими метод монолекулярного секвенирования позволит решить еще одну важнейшую задачу, стоящую перед современной молекулярной биологией, а именно, быстрое определение паттернов метилирования и других химических модификаций нуклеотидов в организме. Как было установлено исследованиями последних лет, такие изменения, называемые эпигенетическими модификациями, обеспечивают передачу большого потока наследственной информации в дополнение к кодируемому последовательностью четырех нуклеотидов и способны вызывать некоторые болезни, в частности рак, диабет и пагубные зависимости. Новый сенсор, как считают его создатели, позволит своевременно выявить предрасположенность к этим заболеваниям и проводить профилактические процедуры, снижающие риск их развития.

Наиболее продвинутым в коммерческом плане методом полупроводникового секвенирования является разработка американской фирмы Ion Torrent (сейчас подразделение корпорации Life Technologies), известная под торговой маркой Ion Proton™. В их методе используется параллельная обработка информации с помощью массива из ячеек рН сенсоров до 650 млн штук на чип в форме глубоких лунок (колодцев) микронных размеров с шагом в несколько микрон. На дне колодцев расположены металлические затворы с плавающим потенциалом, поверх которых нанесен рН чувствительный слой из диэлектрика (нитрида кремния Si_3N_4 или оксида тантала Ta_2O_5). Над диэлектриком расположено эмульсионное ион-селективное покрытие с носителями моноклонов ДНК, вызывающие изменения рН при встраивании в ДНК нуклеотида из-за выделения всего одного протона. Это позволяет читать нуклеотидные последовательности по наличию или отсутствию электрически регистрируемого изменения рН при пропускании через проточную ячейку индивидуальных субстратов ДНК-полимеразы

(дезоксинуклеозидтрифосфатов дАТФ, дГТФ, дТТФ и дСТФ), полученных методом ПЦР.

В секвенаторе Ion Proton™ носителями моноклонов ДНК служит эмульсия с пластиковыми микросферами диаметром 3 мкм, расположенная на дне лунок сенсоров. Применение нанопроволочных транзисторов с микро- и нанопористыми твердотельными покрытиями ионно-чувствительного слоя может существенно упростить технологию и разрешающую способность ДНК секвенатора.

4. Требования и подходы к перспективным РОС-системам

Идеальное устройство для РОС-иммунодиагностики, согласно мнению экспертов, должно обладать следующими характеристиками: маленький объем образца (не более 30 мкл цельной крови), время получения результата не более 5–10 минут, простота в использовании, самовалидация и самокалибровка сенсорного элемента, высокая точность анализа (не хуже чем у теста, выполненного с применением специализированного лабораторного оборудования высококвалифицированными специалистами), себестоимость одного картриджа или чипа для устройства порядка \$1. Например, возможны следующие варианты целевых тестов на базе единой универсальной платформы:

- определение кардиомаркеров для пациентов с повышенным риском развития инфаркта миокарда;
- определение уровня гормонов для пациентов с хроническими заболеваниями эндокринной системы;
- определение маркеров заболеваний, передающихся половым путем;
- экспресс-определение внутрибольничных инфекций для персонала стационаров.

Ключевым требованием для данной универсальной платформы является чувствительность и специфичность анализа, которая должна быть не ниже, чем у традиционных лабораторных методов.

Удовлетворить всем перечисленным требованиям сегодня можно на основе устройств с кремниевыми полевыми транзисторами. Это единственный артефакт, произведенный человечеством в уникальных масштабах. Сейчас на каждого жителя Земли приходится более 10 млрд этих приборов, а стоимость каждого экспоненциально падает на протяжении последних 50 лет. Массовый выпуск нанопроволочных транзисторных биосенсоров с требуемыми параметрами не является проблемой для стандартной кремниевой микроэлектроники. Задачей является совмещение органических и неорганических материалов в одном устройстве и обеспечение приемлемого жизненного цикла биосенсора.

Развитие рынка РОС-систем будет определяться в первую очередь темпами снижения их цены, а также повышением функциональности. Снижение стоимости может быть обеспечено упрощением технологии изготовления за счет использования матриц нанопроволочных транзисторов вместо флюоресцирующих меток и сложных микрофлюидных систем с внешними насосами, массовостью производства интегральных схем электрохимических биочипов, как для приборов ИТ-сектора. Улучшения функциональности и универсальности приборов будет достигнуто разработкой новых технологий и конструкций сенсоров и методов анализа. Так от сложных микрофлюидных систем пробоотбора и пробоподготовки (растворения или прекоцентрации аналита) можно отказаться, если вместо измерения статических характеристик нанопроволочных транзисторов перейти к высокочастотным измерениям, позволяющим выйти за ограничения по концентрации ионов в растворе. Использование одноразовых чипов с нанотранзисторами на гибких подложках обеспечит их дешевизну, требуемую чистоту и достоверность биомедицинских исследований.

Заключение

На основе анализа появившихся зарубежных публикаций, разработок авторов настоящей статьи показано, что сегмент point-of-care (РОС) лабораторной диагностики (диагностики по месту лечения больного) является значительной отраслью мировой индустрии лабораторной диагностики, с большим потенциалом роста. Несмотря на то, что РОС-устройства для определения уровня глюкозы, а также портативные биохимические анализаторы, уже прочно вошли в медицинскую практику, проблема автоматизации иммунодиагностических исследований в формате портативных надежных РОС-устройств пока не решена. Поэтому иммунодиагностические РОС-тесты, в том числе на кардиомаркеры присутствуют на рынке только в формате экспресс-полосок, которые имеют недостаточную чувствительность и специфичность, и это

сильно ограничивает область их применения. Компании, работающие в области лабораторной диагностики, регулярно предпринимают попытки создания и вывода на рынок устройств для РОС-иммунодиагностики, но пока ни одно из них не вошло широко в медицинскую практику из-за их технической сложности и/или высокой стоимости.

В результате использования оригинальных конструкторских, технологических и программных решений наши прототипы не уступают лучшим мировым аналогам либо превосходят их по техническим характеристикам, что может стать основой их конкурентоспособности на рынке. Особое внимание должно быть уделено возможности использования в них максимально дешевых расходных материалов и реагентов, что сделает эксплуатацию приборов существенно выгоднее, по сравнению с аналогами. Также должно быть организовано собственное производство расходных материалов и реагентов, предназначенных для решения наиболее актуальных диагностических задач практического здравоохранения.

Список использованных источников

1. O. V. Naumova, Yu. V. Nastaushev, Svitashva et al. MBE-grown Si whisker structures: morphological, optical and electrical properties//Nanotechnology, v. 19, 2008.
2. O. V. Naumova, V. P. Popov, L. N. Safronov, B. I. Fomin et al. Ultra-Thin SOI Layer Nanostructuring and Nanowire Transistor Formation for FemtoMole Electronic Biosensors//ECS Transactions, V. 25, № 10, 2009.
3. G. S. Kulkarni, Zh. Zhong. Detection beyond the Debye Screening Length in a High-Frequency Nanoelectronic Biosensor//Nano Lett, V. 12, 2012.
4. A. Jain, P. Nair, M. A. Alam. The Flexure-FET Biosensor to Break the Fundamental Sensitivity Limits of Nanobiosensors using Nonlinear ElectroMechanical//Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 109, № 24, 2012.
5. Yu-Shiun Chen, Chia-Hui Lee, Meng-Yen Hung, Hsu-An Pan, Jin-Chern Chiou, and G. Steven Huang. DNA sequencing with electrical conductance measurements of a DNA polymerase//Nature Biotechnology, № 8, 2013.

Electronic biochemical nanosensors for clinical research

V. P. Popov, Head of the Laboratory, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Doctor of physical and mathematical sciences.

A. V. Tronin, Director of Medical Biological Union, Ltd. (MBU).

A. V. Glukhov, deputy general director.

Yu. D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory.

The paper provides an overview of basic decisions for the formation of immunodiagnostic devices using electronic components — biochemical nanosensors foreign authors and authors. Reasonable prospects of application of biosensors for modern diagnostic devices. The analysis of foreign and domestic market are given.

Keywords: apparatus for immunoassay, nanosensors, biochemical nanosensors РОС-system.