

УДК 543.9:57.084:57.033

БИОСЕНСОРЫ – ДВИЖЕНИЕ ОТ МАКРО- К МИКРО- И НАНОРАЗМЕРАМ

© 2020 г. А. Н. Решетилов^{1,2,*}, П. М. Готовцев³, А. К. Сандраморти⁴, Р. Г. Василов³

¹ *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФГБУН “ФИЦ ПНЦБИ РАН”, Пушкино, Россия*

² *Тульский государственный университет, Тула, Россия*

³ *Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия*

⁴ *Институт наук и технологий, Каттанкулатур, Тамил Наду, Индия*

*E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 22.05.2020 г.

После доработки 22.05.2020 г.

Принята к публикации 25.05.2020 г.

Рассмотрена тенденция в разработке биосенсоров, которая проявляется в переходе от макро- к микро- и наноустройствам. При успешном взаимодействии биохимических/биотехнологических и микроэлектронных технологий этот процесс ускоряется за счет использования наноматериалов. Аналогичная тенденция имеет место в разработке биотопливных элементов. Несмотря на то что размеры биосенсора не подлежат точной количественной оценке и не имеют первостепенного значения, важно обращать на них внимание при планировании практического применения аналитической аппаратуры. Наиболее эффективные примеры использованы для иллюстрации снижения физических размеров биосенсоров от момента их создания в начале 60-х годов и до настоящего времени.

DOI: 10.1134/S1992722320010045

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Макробиосенсоры; биоэлектроды первой генерации
 2. Появление микробиосенсора
 3. Микронанобиосенсор
 4. Поиск материалов и схем сопряжения с ферментами
 5. Нанобиосенсоры
 6. Нанобиосенсор на основе одиночных молекул
- Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Первый биосенсор (БС) создан американским профессором Лиландом Кларком в середине XX столетия [1]. В научном мире это событие было отмечено в некотором смысле как революционное. Оно действительно привнесло новую волну представлений о том, какие изменения – простоту, скорость выполнения, точность и другие, – можно внести в суть многих типов биохимических анализов. Научная сторона изобретения была доложена на собрании Американской академии наук и его общая популяризация при-

обрела широкий масштаб. Суть изобретения состояла в том, что предложен новый вариант биохимической оценки присутствия определенных компонентов в исследуемом образце. В частности, Л. Кларк демонстрировал, как новый метод можно использовать для быстрого определения концентрации глюкозы в крови человека. Принцип анализа прост. На электрод, который представлял собой платиновую пластинку, наносили фермент глюкозооксидазу; при появлении глюкозы в образце электрод генерировал ток, который зависел от концентрации глюкозы. Продолжительность анализа составляла минуты. Л. Кларк объяснял, что он постоянно думал о том, насколько неуклюжими являлись традиционные биохимические методы анализа, на которые для подобных определений требовалось порядка десятков минут. Первый БС имел большие размеры – измерительная часть была около 1 см – и относился к макроустройствам. Волна развития БС-индустрии привела к тому, что размеры биохимических устройств – БС – претерпевали изменения. Биосенсоры при сохранении основного назначения – использовать биоматериал для выполнения анализа – приобретали все более малые размеры.

В данном обзоре рассмотрена тенденция снижения размеров БС. Они характеризуются несколькими значимыми параметрами, например чувствительностью, временем измерения, временем жизни и другими. Эти параметры поддаются количественной оценке и на ее основании можно расположить БС в ряд – более чувствительный, менее чувствительный и т.д. Оценка БС по размерам не входит в разряд жестких характеристик. Тем не менее можно отличать БС на основе электрода типа Кларка от БС, встроенного в контактную линзу человека; последний тип будет меньше, чем БС Кларка, размера, т.е. можно говорить, микроразмера. Тем не менее такая оценка довольно субъективна и это следует принимать во внимание.

В этой связи цель данного обзора состоит в том, чтобы рассмотреть “эволюцию” биосенсорных разработок и представить данные, которые могут быть полезны при построении следующего ряда БС – макро-, микро- и наноразмерные. Исследователи стремятся к созданию миниатюрных БС. Если рассматривать биосенсорику как результат сопряжения двух технологий – биохимической/биотехнологической и микроэлектронной, то можно отметить, что несомненные успехи в создании миниатюрных БС в значительной степени принадлежат прогрессу микроэлектронной технологии, в частности применению подходов по созданию новых микросхем, встраиванию биологической компоненты в микросхемы, применению наноматериалов. Поскольку объем исследований указанных областей невероятно широк и отследить все возникающие направления невозможно, в данном обзоре приводятся лишь некоторые примеры, отражающие общую тенденцию.

1. МАКРОБИОСЕНСОРЫ; БИОЭЛЕКТРОДЫ ПЕРВОЙ ГЕНЕРАЦИИ

Биосенсор представляет собой аналитическое устройство, с помощью которого проводят измерение неизвестной концентрации какого-либо соединения. Особенностью любого БС является использование биологического материала как основной его части, измерительной. При взаимодействии с определяемым веществом биологический материал изменяет свои свойства, что может быть зарегистрировано преобразователем и в конечном счете включено в состав БС электронным устройством. Назовем три известных поколения БС. Такое разделение позволяет отчасти представить, от чего могут зависеть размеры БС. Первое поколение БС основано на использовании оксидов, окисляющих исследуемое соединение, и регистрации этой реакции [2]. Во втором поколении БС для передачи электронов из активного центра ферментов на электрод использовали ме-

диаторы электронного транспорта. Главная особенность медиаторов – способность к обратимому окислению и восстановлению [3]. Третье поколение БС основано на прямом переносе электронов от фермента на регистрирующий электрод [4]. В сущности, размеры БС в этих случаях определяются количеством иммобилизованного фермента, что определяет площадь поверхности рабочего электрода. По данному принципу устроена значительная часть электродов – электрохимических, колориметрических, оптических. Несмотря на заложенную принципиальную миниатюрность БС, которая отмечается в работах, отражающих их параметры [5], хронологически первые типы БС в большинстве своем следует отнести к макро-БС. На первых этапах развития технологии создания БС применение методов микроэлектронной техники широко не практиковалось.

Попытки уменьшить размеры и стандартизировать характеристики привели к созданию БС на основе электродов, полученных матричной печатью [6]. Однако при своей миниатюрности такие БС в большей степени относятся к макро-электродам. Так, типичный размер измерительной части электрода, содержащего фермент, составляет величину 4–6 мм²; размер электрода увеличивает наличие вспомогательного и электрода сравнения, площадь каждого в отдельности составляет 1–3 мм².

Очередной этап снижения размеров был связан с применением в качестве преобразователей ион-чувствительных полевых транзисторов (ПТ). В первую очередь для создания БС стали использовать рН-чувствительные ПТ. рН-чувствительность обеспечивалась использованием в измерительной части ПТ таких диэлектрических покрытий, как пятиокись тантала, нитрида кремния, которые обеспечивали близкую к теоретической химическую чувствительность. Площадь рецепторной зоны, содержащей иммобилизованный материал, у ПТ была значительно меньше соответствующей площади электродов, полученных матричной печатью, и могла составлять десятки квадратных микрометров. Такие ПТ применяли для иммобилизации ферментов [7], микробных клеток [8], мембранных фракций бактерий, содержащих фоточувствительные белки [9, 10]. Несомненно, БС с такой малой площадью рецепторного поля представляли вариант если еще не в полном смысле микро-БС, то осязаемое приближение к ним.

Следует отметить, что в определении “макро-микро-нано” также присутствует такой фактор, как реальный размер БС. При конструировании БС немалое внимание уделяется удобству ручной манипуляции. Поэтому в некоторых случаях, например при использовании электродов, получен-

ных матричной печатью, производители обеспечивают удобство манипуляции электродом при измерениях и создают такие модели, которые позволяют вручную подключать электроды к измерительному устройству. С этой точки зрения БС, основанные на матричных электродах, не являются микро-БС ни по принципу общей конструкции, ни по принципу величины измерительной площади. Биоэлектроды, представленные ПТ с иммобилизованным биоматериалом, являются очевидным примером микро-БС по размерам измерительной зоны, но более принадлежат к классу “макро” по внешним размерам, позволяющим удобно оперировать с ними вручную.

Вопрос, имеет ли смысл в настоящее время при широких возможностях микроэлектронной техники продолжать создание макро-БС, содержит положительный ответ. Удобство манипулирования позволяет использовать такие БС для решения многих аналитических задач, не требующих абсолютной миниатюризации. Вторым аргументом состоит в том, что многие БС в процессе приближения их к использованию должны пройти практические испытания, которые более удобно проводить на моделях БС традиционного классического макроизготовления.

2. ПОЯВЛЕНИЕ МИКРОБИОСЕНСОРОВ

В раздел “микро-БС” попадает значительное количество сенсоров, для создания которых используется микроэлектронная техника, включая МЭМС-технологии (микроэлектромеханические системы). Подробное освещение вопросов, какие методы микроэлектроники применяются, материалы электродов и т.д. можно найти в обзорах [11–13], в которых рассматриваются методы получения проводящих подложек, миниатюрных электродов, применение наноматериалов, использование 3D-принтеров, изготовление оптических устройств для регистрации световых эффектов. В перечень материалов входят стеклянные и кремниевые подложки, различные пластики и эластомеры, ткани.

В настоящее время широко используются БС, которые собираются на структурах, называемых “лаборатория на чипе” (ЛНЧ) (“lab-on-a-chip”, “micro total analysis systems” LOC; μ TAS). Это микро-БС, которые представляют собой миниатюрный прибор, осуществляющий один или несколько многостадийных биохимических процессов на чипе площадью от нескольких квадратных миллиметров до нескольких квадратных сантиметров и использующий микроколичества как образца, так и анализирующего биоматериала для пробоподготовки и проведения измерений. Концепция ЛНЧ была предложена в начале 1990-х годов в качестве одного из путей интегра-

ции всех стадий биохимического анализа в едином устройстве. Ключевым элементом ЛНЧ является микрофлюидное устройство, представляющее собой стеклянную или пластиковую основу, в которой реализованы различные операции пробоподготовки, выделения, сортировки и анализа биологической пробы. Преимуществами такого подхода являются снижение расхода реагентов, уменьшение времени и стоимости анализа, повышение чувствительности системы детектирования. К настоящему времени усилиями большого количества исследователей разработаны технологии изготовления микрофлюидных устройств и продемонстрирована реализация отдельных аналитических задач [14].

В будущем использование ЛНЧ-технологий позволит значительно снизить время и стоимость цикла разработки лекарственных препаратов, диагностировать заболевания на ранней стадии и адаптировать терапию под каждого конкретного пациента. Подразумевается, что микрофлюидные технологии будут применяться для ранней диагностики заболеваний с помощью устройств персональной медицины, использоваться для тестирования загрязнений окружающей среды [15].

Одно из первых предложений по созданию микро-БС и их практическая реализация были выполнены проф. I. Karube в 1999 г. Был создан миниатюрный ферментный биотопливный элемент (БТЭ). Биотопливные элементы по многим функциям и конструкции принципиально приближаются к БС электрохимического типа. Японские исследователи создали БТЭ, содержащий 25 микросенсоров, включаемых последовательно. Общий размер электронного чипа составлял $40 \times 50 \text{ мм}^2$; планировалось, что развиваемая мощность будет составлять единицы ватт [16].

Микробиосенсорная техника может эффективно использоваться при решении задач научного поиска. Решение некоторых вопросов связано с применением БС микроразмера. Известно, что популяционные волны микроорганизмов представляют собой удобную лабораторную модель при исследовании вопроса об особенностях бактериального метаболизма, решении задач бактериального взаимодействия типа “волки–овцы” и ряда других [17, 18]. При постановке таких экспериментов часто рассматривают распространение волн бактериальных популяций в агаровых средах, заполняющих чашки Петри. Эти волны имеют форму концентрических окружностей; их возникновение обуславливается хемотактическим ответом и подвижностью бактерий. Теоретические и экспериментальные модели показали, что возможность и характер перехода от одних структур к другим зависят от свойств среды, по которой распространяется волна, в частности от pH питательной среды. Стандартная техника стеклянных

pH-электродов не позволяет регистрировать такие изменения из-за сравнительно большого (1–3 мл) объема проб, необходимых для измерений. Вместе с тем ПТ являются подходящим инструментом в силу малости размеров чувствительной зоны. В исследовании [19, 20] решена подобная задача; для этой цели в агаровый гель до инокуляции бактериальных клеток встраивали ПТ в точки предполагаемого распространения колонии. Измерения в реальном времени показали, что в зависимости от типа среды в зонах прохождения бактериальных волн наблюдается либо закисление (при росте на среде, содержащей глюкозу), либо защелачивание (при росте на пептонной среде). Подобные измерения возможны с силу микроскопических размеров затворной зоны ПТ, производящего оценку pH.

3. МИКРО-, НАНОБИОСЕНСОР

В последнее время интенсивно развивается идея биосенсорной регистрации сигналов непосредственно с поверхности тела человека; это направление представлено в обзоре [21]. Используемые БС относятся к микро-, однако возможно их причисление и к наностройствам. Сложность данного способа регистрации состоит в том, что биосенсорные измерения требуют наличия некоторого количества влаги в биокаталитическом элементе; поэтому у исследователей возникает задача создания влажного состояния биорецептора. Следует подчеркнуть еще одну особенность подобного тестирования – для создания носимых БС и регистрации сигналов достаточно часто применяют сенсоры в виде БТЭ. Их преимущество в сравнении с БС состоит в том, что БТЭ является не только измерительным устройством, но и источником питания. Одно из требуемых условий – миниатюрность электродов. В этой связи важно отметить, что большая часть носимых БТЭ относится к микро- или даже наносенсорам. Одним из наиболее удобных объектов анализа является пот человека, поскольку он включает в себя значительное количество метаболитов, отражающих состояние организма, в частности глюкозу и лактат; оба метаболита содержат высокий индекс биохимической энергии [22]. Исследователи из университета Сан Диего (Калифорния) пошли по пути получения энергии при окислении выделяющегося из организма лактата. Они являлись лидерами в производстве БС на основе временной татуировки; нанесение татуировки на поверхность тела создает проводящую основу, в которую можно встраивать фермент, например лактатоксидазу. Выявили, что при этом можно получить значительную мощность, выражающуюся величинами от 5 до 70 мкВт/см². Др. J. Wang, руководитель данного направления, высказал предположение, что электрическую энергию от микроватт-

ных источников можно собирать с помощью накопителей [23]. При наличии лактата в поту в концентрации 14 mM (средняя концентрация лактата в поту) БТЭ способен заряжать емкость 2.2 мФ при напряжении 3.5 В за 53 с, при этом средняя генерируемая в эксперименте мощность составляет 0.5 мВт. После начального периода БТЭ достигает достаточно высокой мощности, чтобы поддерживать работу беспроводного устройства при 3.5 В в течение 10 мин. Этот пример демонстрирует эффективность БС, находящихся на границе “микро–нано”.

Мощность, генерируемая БТЭ, зависит от активной площади его поверхности. Архитектура анода и катода БТЭ может быть выполнена по принципу “остров–мост”, при этом центральные участки островков (аноды и катоды) должны быть прочно закреплены на гибкой подложке, а змеевидные мостики (контакты) должны свободно поддаваться изгибу и деформации. Созданная архитектура “остров–мост” на основе золотых электродов представляла собой гексагональную плотноупакованную структуру, где аноды и катоды образуют интегрированную электродную систему. Гексагональная плотноупакованная структура может обеспечивать высокий фактор заполнения, а интегрированная электродная структура позволяет располагать аноды и катоды на небольшом расстоянии друг от друга, уменьшая тем самым внутреннее сопротивление. Островки (аноды и катоды) имеют форму круга [24]. Представляет интерес разработка неинвазивных носимых биосенсоров мини-формата для детекции уровня алкоголя в организме. Биосенсоры создаются с помощью временной татуировки и позволяют измерять алкоголь в поту, выделение которого индуцируется препаратами типа пилокарпина. При окислении алкоголя вырабатывается достаточное количество электрической энергии, чтобы питать передающее устройство. Принцип измерения уровня алкоголя основан на использовании преобразователя на основе берлинской лазури и фермента алкогольоксидазы. Новый вариант предлагаемого БС, не содержащего раздражающих кожу элементов, имеет высокую селективность и чувствительность. Биосенсор позволяет с высокой надежностью различать состояние организма до и после приема алкоголя. Биосенсор сопряжен с системой передачи данных, функционирующей с помощью Bluetooth. Интегрирование новой беспроводной системы детекции алкоголя с регистрирующей частью БС является многообещающей для практического использования и может быть использована для того, чтобы рассматривать ее в целом как пример микро-БС [25].

Общий обзор по созданию имплантируемых БТЭ и БС, т.е. микросенсоров, предназначенных для вживления, за период с 1970 по 2013 г. можно найти в [26].

Многие авторы выделяют формирование наиболее затребованных практикой технологий, которая имеет название “Point-of-care technologies, РОСТ” и определяется как набор методов по созданию сенсоров, проводящих анализ вблизи или на исследуемом организме с целью обеспечения здорового состояния пациента. В этом случае речь идет о самой высокой степени миниатюризации – создании нано-БС [27, 28].

Как упоминалось ранее, размер БС в значительной степени определяется типом исследования, в котором предполагается его использование. Высокоактуальной является задача чувствительной детекции низкокопийных белков. Разработка высокочувствительных систем детекции, предназначенных для обнаружения белков в растворах при низких концентрациях (10^{-15} М и менее), является важным направлением современных биомедицинских исследований. Их необходимость обусловлена, прежде всего, потребностью в обнаружении биомаркеров заболеваний, находящихся в биологических жидкостях в низких (10^{-9} – 10^{-14} М) и ультранизких концентрациях (10^{-15} М и ниже). Выявление белковых маркеров онкологических и инфекционных заболеваний на ранней бессимптомной стадии позволит в разы снизить случаи летальных исходов, повысить эффективность лекарственной терапии и качество жизни пациентов [29]. Для решения этой проблемы успешно развиваются биосенсорные методы. К передовым технологиям относятся подходы, основанные на использовании чипов с наноразмерными биосенсорными элементами (нанобиочипы). Детекция биомолекул с использованием нанобиочипов характеризуется высокой селективностью и чувствительностью анализа, а также может выполняться в режиме реального времени и с небольшим количеством анализируемого биологического материала [30, 31]. К передовым относится метод обнаружения белков в растворе с использованием нанопроволочного биосенсора (НП-биосенсор). Чипы, составляющие такой биосенсор, содержат наноразмерные проводники, которые являются сенсорными элементами. НП-биосенсор относится к молекулярным детекторам, позволяющим регистрировать отдельные биологические молекулы в режиме их счета, что определяет высокую концентрационную чувствительность анализа. Принцип работы НП-биосенсора основан на регистрации тока, протекающего через нанопроводник. Биологическая молекула при адсорбции на поверхность нанопроводника меняет его потенциал. Таким образом, биомолекула является локальным “виртуальным” затвором, изменяющим проводимость нанопроводниковых сенсорных элементов чипа. Для биоспецифического анализа необходима функционализация нанопроводников. Наиболее распространена в меди-

ко-биологических исследованиях функционализация поверхности сенсорного элемента с использованием молекулярных зондов – антител или аптамеров. В таком случае на поверхности нанопроводника за счет аффинного взаимодействия формируется комплекс антитело–антиген или аптамер–антиген. Это событие регистрируется электронной системой НП-биосенсора [32]. На сегодняшний день в Российской Федерации разработаны уникальные технологии изготовления чипов к НП-биосенсору, содержащих нанопроводники на основе структур “кремний-на-изоляторе” (КНИ-чипы). Эти микросхемы не уступают по характеристикам мировым аналогам. Главным преимуществом нанопроводников на основе структур КНИ в сравнении с нанопроводниками из иных материалов и отдельно выращенными цилиндрическими нанопроводниками является совместимость методов их изготовления с КМОП-технологией (КМОП – комплементарная металл-окисел-полупроводник-технология). Это определяет потенциал всей системы биосенсора с КНИ-чипами, т.е. КНИ-биосенсора в качестве универсальной платформы для крупномасштабного производства портативных высокочувствительных диагностических систем, доступных для персонализированного применения [33].

4. ПОИСК МАТЕРИАЛОВ И СХЕМ СОПРЯЖЕНИЯ С ФЕРМЕНТАМИ

Важную роль в разработке новых типов БС, в том числе в поиске их миниатюризации, играет исследование свойств различных материалов, которые были бы биосовместимы и при этом обладали бы такими свойствами, как высокая адгезивная способность к материалу подложки измерительного электрода, могли бы сами являться такой подложкой, имели бы высокую электропроводность, механическую прочность и т.д. С этой точки зрения интересны исследования по изучению электрохимических свойств углеродных материалов, полученных методом электроформования [34]. В работе были рассмотрены четыре типа углеродных волокнистых материалов (УВМ), полученных методом электроформования из растворов полиакрилонитрила. Углеродные волокнистые материалы сопрягали с микробными клетками *Glucanobacter oxydans* или с их мембранными фракциями (МФ). Исследовали биоэлектрохимические характеристики электродов (хроно- и вольтамперометрические, импедансные спектры). Электроды рассматривали как модель анода микробного биотопливного элемента (мБТЭ); окисляемым субстратом являлся этиловый спирт. Спектры масс-спектрометрического исследования показали, что МФ сохраняют белковую структуру целых клеток и поэтому могут использоваться как аналоги целых клеток. Ав-

торы выявили, что наибольшей мощностью и стабильностью обладал мБТЭ на основе углеродного волокнистого материала, полученного при кратковременной экспозиции исходного материала в среде с высокой (1000°C) температурой. Важным оказался факт, что в случае использования МФ в качестве биокатализатора для всех исследованных УВМ наблюдали безмедиаторный перенос заряда. Полученные результаты могут быть успешно использованы при конструировании биосенсоров и мБТЭ.

Интересный подход к поиску миниатюризации и способов длительного сохранения каталитической активности иммобилизованного фермента был представлен в работе [35] по использованию полиэлектролитных микрокапсул (ПЭМ) как основного матрикса, удерживающего белок. Целью изучения являлось сравнение характеристик глюкозного биосенсора при двух способах иммобилизации фермента глюкозооксидазы на поверхности матричного электрода, модифицированного берлинской лазурью, – инкапсулированием фермента в полиэлектролитные слои либо в гель хитозана. Для создания ПЭМ использовали полистиролсульфонат натрия и поли(полиалиламингидрохлорид). Фермент, иммобилизованный в ПЭМ, оказался более чувствительным к молярности буферного раствора и обладал более высокой константой Михаэлиса. Показали, что введение в состав полиэлектролитных микрокапсул, сформированных на основе screen printed electrodes, многостенных углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы, снижало практически на два порядка импеданс биорецепторного слоя; этот результат означает, что таким образом можно повысить эффективную каталитическую активность фермента и при необходимости снизить его содержание в биорецепторе и указать путь к снижению размеров БС.

Сопряжение полимеров с другими материалами (полимерами, ферментами, наночастицами) находит широкое применение в биомедицинской инженерии, биосенсорике. Одно из современных направлений состоит в разработке новых платформ для детекции соединений, для которых ранее уже были разработаны БС. При этом движущей силой является задача не только улучшения аналитических параметров, но и снижения размеров сенсора. В [36] для иммобилизации алкогольоксидазы использовали модифицированный фтором поли(этиленгликоль) и многостенные углеродные нанотрубки. Полученный БС имел микроразмеры (диаметр 3 мкм) и был проверен при измерении алкоголя в различного типа спиртных напитках. Исследование, направленное на достижение аналогичной цели, представлено в [37]. Авторы применили новый, ранее не использованный материал – тиклопидин – как составную часть для формирования алкогольного

БС. Биорецептор имел структуру “Гемоглобин/Тиклопидин/ TiO_2 /Наночастицы”. В качестве наночастиц, обеспечивающих высокую площадь поверхности и высокую электрическую проводимость, применили титановую пудру, которую получали путем гидролиза алкоксида титана. Следует отметить, что электрод данного типа относится к макроэлектродам, поскольку основой служил макростержень из стеклогуглерода. Этот пример еще раз подчеркивает соображения, что в некоторых случаях для демонстрации нового эффекта используют макроуровневые системы. Созданный электрохимический БС, не содержащий этанолюксилирующего фермента, был предназначен для анализа этилового спирта в напитках различного рода и обладал высокой чувствительностью; при необходимости такая модель БС могла бы быть трансформирована в миниатюрную систему анализа.

5. НАНОБИОСЕНСОРЫ

Типичными примерами наноразмерных биосенсоров могут служить аналитические системы на основе наночастиц [38, 39]. Наночастицы могут обладать эффективными каталитическими свойствами, быть биосовместимыми, иметь высокую электрическую проводимость. Эти свойства позволяют использовать их в различных типах сенсоров, как в оптических, так и электрохимических. При этом сенсор может быть как биологическим, так и небиологическим. Наночастицы золота (AuNP) наиболее часто используются из-за их высокой устойчивости к окислению, низкой токсичности и способности к усилению сигнала сенсора. Применение таких частиц приводит к повышению чувствительности и пределов обнаружения до одной молекулы в пробе [40]. Наночастицы также могут выступать как альтернативные биораспознающие элементы [41]. Обладая электрокаталитическими свойствами, наночастицы в составе сенсора могут заменять ферментные препараты [42, 43].

Сравнительно недавно появились работы, в которых рассматривался электрохимический принцип секвенирования ДНК, основанный на использовании нано-БС. Было показано, что в процессе встраивания ДНК-полимеразой очередного дезоксирибонуклеотидтрифосфата в иммобилизованную одноцепочечную матричную ДНК в соответствующим образом устроенном электроде происходят два биоэлектрохимических процесса – выделение протона и возникновение импульса [44–46]. Созданный прибор в главной части состоит из регистрирующей полупроводниковой матрицы, включающей в себя набор ПТ; их число в первой модели описанного секвенатора составляло 1.5 млн, каждый из которых содержал измерительную ячейку объемом 10^{-9} мкл. Для

формирования электродной структуры чипа были использованы методы микроэлектронной технологии.

Удивительные результаты, демонстрирующие высочайшую степень миниатюризации в получении функционирующих наноустройств и фактический выход на практическое применение, продемонстрированы в [47]. Авторы представили микросхему, содержащую 3 млн одиночных БТЭ. В качестве фермента в аноде использовали глюкозооксидазу, в катоде – лакказу; для улучшения проводимости в конструкции использовали одностенные углеродные нанотрубки. Биотопливный элемент функционировал в режиме прямого переноса заряда. Достижимая удельная энергия и плотность тока составляли соответственно 18 мВ/см² и 90 мА/см², что на два порядка превышало известные к моменту публикации параметры известных БТЭ.

6. НАНОБИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ

Значительный прогресс в создании миниатюрных сенсоров приобретают БС с минимизированными размерами. В [48] описана планарная технология, позволяющая создавать нано-БС, содержащие незначительное количество биоматериала. Для создания планарной наноструктуры нанoeлектронного преобразователя может быть использована технология подвешенной жесткой маски, методы стандартной литографии, реактивное ионное травление [49]. Величина получаемой структуры позволяет проводить на сформированные электроды иммобилизацию одиночной или группы молекул. Фиксацию молекулярных объектов в измерительных нанопроводах проводят в нанозазорах с использованием, например, технологии электромиграции [50]. В [48] иммобилизацию фермента глюкозооксидазы на нанозазоре осуществляли на поверхности электрода кросс-сшивкой глутаровым альдегидом. Регистрация циклических вольтамперных зависимостей показала, что в отсутствие глюкозы фактически регистрируется незначительный омический ток. Введение глюкозы в концентрациях до 10 мМ приводило к появлению значительного тока, вызванного окислением субстрата. Созданная модель нано-БС может служить основой для широкомасштабного производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве общего заключения можно отметить несколько основных положений в отношении физических размеров БС. Действительные размеры создаваемых БС от момента их первой демонстрации и до настоящего времени существенно изменились, что выражено снижением

размеров. Снижение размеров стало возможным благодаря применению методов микроэлектроники и общему повышению уровня понимания основных биологических/биотехнологических параметров биоматериала. Снижение размеров БС имеет основу, позволяющую говорить об имплантации некоторых БС, о применении БС “на месте”. Для этого БС и исследуемый организм должны быть или на незначительном расстоянии, или в непосредственном контакте. Такая ситуация должна привести к существенному улучшению качества жизни.

Не менее существенным и отличающимся высокой актуальностью является контроль качества окружающей среды. Детекция водных, воздушных фаз и управление их состоянием также определяют качество жизни. Указанные проблемы могли бы решаться более оперативно с помощью микро- и нано-БС.

Если попытаться предсказать дальнейшие тенденции развития БС-области, в том числе в смысле трансформации размеров БС, что довольно сложно, можно предположить, что исследователи будут стремиться разрабатывать еще более миниатюрные устройства – БС, БТЭ, которые легко можно будет сопрягать с живым организмом, внедрять в контрольные системы оценки качества окружающей среды. При этом нужно помнить и слова, которые Serge Cosnier [26], приводящий множество примеров вживления БС и БТЭ в организм человека и животных, приводит на суммирующей диаграмме; это выражение: “Люди снабжают энергией свои собственные имплантированные устройства?”. В этой риторической фразе автор как бы стимулирует читателей дать свою собственную оценку этому факту, т.е. оценить – это решение является положительным или отрицательным. Вероятно, люди будут счастливы, если научные исследования помогут минимизировать структуру под названием биосенсор до мельчайших размеров и использовать ее на благо человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов 19-58-45011 (раздел Введение и пункты 1-3) и 18-29-23024 (раздел Заключение и пункты 4-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heineman W.R., Jensen W.B.* // Biosens. Bioelectron. 2006. V. 21. № 8. P. 1403. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.12.005>
2. *Clark L.C., Lyons C.* // Ann. NY Acad. Sci. 1962. V. 102. P. 29.
3. *Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D et al.* // Anal. Chem. 1984. V. 56. P. 667.
4. *Berisha L., Kalcher K., Hajrizi A., Arbneshi T.* // Am. J. Anal. Chem. A. 2013. V. 4. № 6. P. 27.

5. *Theâvenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S.* // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. № 12. P. 2333.
6. *Domíngucz-Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos-Martínez M.J.* // Talanta. 2007. V. 73. № 1–2. P. 202.
7. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тихоненко С.А., Дубровский А.В. // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 11. С. 1186.
8. Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н. // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 12. С. 883. <https://doi.org/10.1134/S0044450219120090>
9. *Gotoh M., Eiichi T., Karube I.* // J. Membrane Sci. 1989. V. 41. № 5. P. 291.
10. *Tanabe K., Hikuma M., Soomi L. et al.* // Biotechnology. 1989. № 10. P. 12.
11. *Lim J.W., Ha D., Lee J. et al.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 11 May 2015 (Detection technologies and micro/nano biodevices for medical and biological applications. Review article. Ch. 2). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00061>
12. *Kim M., Lim J.W., Kim H.J. et al.* // Biosens. Bioelectron. C. 2014. V. 65. P. 257. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.028>
13. *Wang B.L., Ghaderi A., Zhou H. et al.* // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. P. 473. <https://doi.org/10.1038/nbt.2857>
14. Лукьяненко К.А., Денисов И.А., Якимов А.С. и др. // Биотехнология. 2016. Т. 32. № 5. С. 69.
15. *Lukyanenko K.A., Belousov K.I., Denisov I.A. et al.* // Micro Nano Lett. 2017. V. 12. P. 377.
16. *Sasaki S., Karube I.* // Trends Biotechnol. 1999 V. 17. № 2. P. 50. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01243-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01243-8)
17. Решетилов А.Н., Медвинский А.Б., Елисеева Т.Н. и др. // Докл. АН СССР 1992. Т. 323. № 5. С. 971.
18. Цыганов М.А., Медвинский А.Б., Пономарева В.М. и др. // Докл. АН СССР. 1989. 306. № 3. С. 731.
19. Решетилов А.Н., Медвинский А.Б., Елисеева Т.Н. и др. // Докл. АН СССР 1992. Т. 323. № 5. С. 971.
20. Шахбазян В.Ю., Медвинский А.Б., Цыганов М.А. и др. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 321. № 2. С. 407.
21. *Jia X., Dong S., Wang E.* // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 76. P. 80.
22. *Bandodkar A.J., Wang J.* // Trends Biotechnol. 2014. V. 32. № 7. P. 363.
23. *Jia W., Bandodkar A.J., Valdés-Ramírez G., Windmiller J.R. et al.* // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 6553.
24. *Bandodkar A.J., You J.-M., Kim N.-H. et al.* // Energy Environ. Sci. 2017. V. 7. P. 363. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.04.005>
25. *Kim J., Jeerapan Itmani S., Cho T.N.* // ACS Sens. 2016. V. 1. P. 1011. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00356>
26. *Cosnier S., Goff A., Holzinger M.* // Electrochem. Commun. 2014. V. 38. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.09.021>
27. *Quesada-González D., Merkoçi A.* // Chem. Soc. Rev. 2018. V. 47. № 13. P. 4697. <https://doi.org/10.1039/C7CS00837F>
28. *Quesada-González D., Merkoçi A.* // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 92. P. 549. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.062>
29. *Cho H.-H., Lee J., Kim J. et al.* // Sensors. 2018. V. 18. P. 207.
30. *Patolsky F., Zheng G., Hayden O. et al.* // PNAS. 2004. V. 101. № 39. P. 14017.
31. *Todd J., Freese B., Lu A. et al.* // Clin. Chem. 2007. V. 53. P. 1990.
32. *Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F. et al.* // Lab. Chip. 2012. V. 12. № 23. P. 5104.
33. *Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O. et al.* // J. Nanotechnol. 2018. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2018/9549853>
34. Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г. и др. // Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 9–10. P. 77.
35. *Plekhanova Yu.V., Tikhonenko S.A., Dubrovsky A.V. et al.* // Anal. Sci. 2019. V. 35. P. 1037. <https://doi.org/10.2126/analsci19P131>
36. *Bekmezci S.A., Soylemez S., Yilmaz G. et al.* // Eur. Polym. J. 2020. V. 122. doi.org/ <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109300>
37. *Harraz F.A., Ismail A.A., Ibrahim A. et al.* // Chem. Phys. Lett. 2015. V. 639. P. 238.
38. *Kurbanoglu S., Ozkan S. A.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. V. 147. 439. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.062>
39. *Li Y., Wang Z., Sun L. et al.* // Trends Anal. Chem. 2019. V. 113. P. 74.
40. *Vigneshvar S., Sudhakumari C.C., Senthilkumaran B. et al.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2016. V. 4. № 11. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
41. *Qi P., Wang J., Wang Z. et al.* // Electrochim. Acta. 2018. V. 274. P. 406.
42. *Hsu C.-W., Su F.-C., Peng P.-Y. et al.* // Sensors Actuators B. 2016. V. 230. P. 559.
43. *Xu J., Chen T., Qiao X.* // Colloids Surf. A. 2019. V. 561. P. 25.
44. *Purushothaman S., Toumazou C., Ou C.P.* // Sens. Actuators. B. Chem. 2006. V. 114. P. 964.
45. *Pourmand N., Karhanek M., Persson H.H.* // J. PNAS. 2006 V. 103. № 17. P. 6466.
46. *Rothberg J.M., Hinz W., Bustilo J.* // Nature. 2011. V. 475. P. 348.
47. *Kanwal A., Wang S.C., Ying Y. et al.* // Electrochem. Commun. 2014. V. 39. P. 37. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.12.010>
48. Каушин В.В., Колесов В.В., Крупенин С.В. и др. // Радиоэлектроника. Наносистемы. 2013. Т. 5. № 2. С. 45.
49. *Steinmann P., Weaver J.* // Vac. Sci. Technol. B. 2004. V. 22. P. 3178.
50. *Park H., Lim A.K.L., Alivisatos A.P.* // App. Phys. Lett. 1999. V. 35. P. 2.