УДК 549.516.22, 543.555

СИНТЕЗ И МОДИФИКАЦИЯ НАНОСТРУКТУР ОКСИДА ЦИНКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА

М.А. Ширяев, А.Н. Баранов

Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия shiryaev.michael@gmail.com

PACS 81.07.Gf, 87.85.fk

В настоящей статье описан синтез и модификация наноструктур оксида цинка для биоаналитических применений. Были изучены свойства модифицированного массива наностержней оксида цинка, а также предложена оригинальная схема устройства для создания кондуктометрического иммуносенсора

Ключевые слова: оксид цинка, биосенсоры, наностержни, модификация.

1. Введение

Экспрессное детектирование биологических маркеров заболеваний, мониторинг окружающей среды, контроль качества продукции пищевой промышленности — вот лишь наиболее наглядные примеры задач, при решении которых наука сталкивается с необходимостью точного, быстрого и селективного определения тех или иных аналитов. В настоящее время для данных целей разрабатываются биосенсоры, призванные заменить дорогостоящие, сложные и длительные процедуры классической биоаналитики.

Концепция биосенсоров была предложена в начале 1960х годов Кларком и Лайонсом [1]. Биосенсоры — аналитические устройства, преобразующее изменение физических или химических свойств биологического рецептора (биоматрицы) в электрический или другие виды сигналов, амплитуда которых зависит от концентрации определяемых аналитов [2,3].

Необходимым свойством биоматрицы должна являться селективность реакции с выбранным аналитом. В природе можно наблюдать исключительную селективность в процессе иммунного ответа, в ходе ферментативных реакций и комплементарных взаимодействий. В этой связи для создания биосенсоров используются ферменты [4, 5], антитела [6, 7], одноцепочечные последовательности ДНК (аптамеры) [8]. Биосенсоры использующие в качестве биоматрицы антитела (иммуносенсоры), нашли применение для детектирования широкого спектра разнообразных соединений. Причина этого в том, что моноклональные антитела, полученные по методу, предложенному Кёхлером и Мильштейном [9], обладают практически неисчерпаемым разнообразием и могут продуцироваться под воздействием огромного множества антигенов. В частности, иммуносенсоры на основе оксида цинка были разработаны для определения важных биологических маркеров, таких, как α -1-фетопротеин (AFP) [10], С-реактивные белок (CRP) [11].

Оксид цинка (ZnO) обладает свойствами, необходимыми для биоаналитических применений: он является нетоксичным, обладает химической стабильностью, электрохимической активностью, большим сродством к переносу электрона, а также высоким значением энергии связи экситона и возможностью излучения в видимом и УФ-диапазоне [12]. Стоит отметить способность ZnO к регулированию проводимости в широких пределах с помощью его легирования [13].

Важной особенностью ZnO является относительная простота получения самых разнообразных наноструктур, от наночастиц размером с десяток нанометров до стержней микрометровой длины, как на подложке, так и в виде коллоидных растворов [14, 15]. Для получения наноструктур ZnO используются методы синтеза из газовой фазы [8, 16], гидротермального синтеза [17], синтеза из солевых матриц [18], синтеза с использованием органических растворителей [19] и другие методы. Практически значимым является тот факт, что поверхность ZnO может быть легко модифицирована (например, кремнийорганическими соединениями [20]) для присоединения биорецептора.

Ввиду уникального сочетания люминесцентных, полупроводниковых и пьезоэлектрических свойств ZnO может применяться для создания биосенсоров, использующих различные принципы регистрации сигнала [21]. Биосенсоры, основанные на регистрации изменения электрических свойств устройства (т.е. электрохимические биосенсоры) являются самым многочисленным и коммерчески успешным классом аналитических устройств [22]. Это связано с возможностью минитюаризации и автоматизации (а, значит, возможности снижения стоимости) устройств.

Среди многообразия структур ZnO, используемых для биоаналитических применений, необходимо отметить такую морфологию, как наностержни (массив наностержней на подложке), которые обладают рядом особенностей. На настоящий день разработано множество методов получения высокоупорядоченных массивов наностержней ZnO [23–25], которые обладают большой площадью поверхности, и, как следствие, высокой нагружаемостью, и позволяют упорядочивать биоматрицу на поверхности ZnO. Другое преимущество наностержней ZnO (как и других полупроводниковых наностержней) заключается в том, что влияние поверхности нанокристаллов (где и происходит биохимическая реакция) на электрохимические свойства довольно велико [26,27]. Если речь идет об измерении проводимости (кондуктометрические сенсоры), то при диаметре стержней меньше 40 нм вклад поверхностных зарядов на проводимость становится определяющим [28]. Таким образом, высокая степень зависимости проводимости наностержней ZnO от состояния их поверхности вкупе с простотой иммобилизации на них биологических рецепторов делает разработку кондуктометрических биосенсоров особенно привлекательной для исследователей.

В настоящей работе описывается синтез и модификация массивов наностержней оксида цинка. Модификация производилась с помощью линкеров, ориентированных на присоединение любых антител через их аминогруппы. Процесс модификации контролировался с помощью ИК-спектроскопии. Для изучения влияния модификации наностержней ZnO на их проводящие свойства измеряли вольтамперные характеристики (BAX) устройства.

2. Экспериментальная часть

Для создания прототипа устройства стеклянная пластинка с нанесенным слоем ITO с помощью травления в концентрированной HBr была разделена на 4 равные площадки размерами $1,1 \times 1,1$ см.

Ориентированные затравки ZnO были нанесены на поверхность пластины согласно методике, описанной ранее [29]. На поверхность пластины накапывался 0,005 M раствор Zn(CH₃COO)₂ в C₂H₅OH и производился отжиг при 350 °C. Данная процедура производилась два раза. Рост наностержней ZnO проводили в гидротермальной ячейке при температуре 110 °C в течение 1,5 часов. Раствор готовили смешиванием 0,2 M раствор $Zn(CH_3COO)_2$ с 20% раствором $NH_2CH_2CH_2NH_2$, доводя pH до 8,5. Пластину с выращенным на ней массивом наностержней ZnO промывали C_2H_5OH и дистиллированной водой, высушивали потоком азота.

Модификацию полученного массива наностержней ZnO проводили в несколько этапов. Вначале пластину вымачивали в течение 4 часов при комнатной температуре в спиртовом растворе 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES), при этом этоксигруппы вступали в реакцию с гидроксигруппами на поверхности ZnO. На второй стадии накапывали раствор глутаральдегида (GA) в натрий-фосфатном буфере (PBS) и выдерживали 14 часов при 3 °C, при этом альдегидные группы GA присоединялись к аминогруппам APTES. На последнем этапе присоединяли моноклональные антитела (MAb) 19F/2A3 на флуоресцеин, полученные из гибридизованных клеток селезенки и миеломных клеток мышей. На рис. 1 представлена схема модификации ZnO и иммобилизации на нем антител с помощью ковалентного связывания.



РИС. 1. Схема модификации ZnO и иммобилизации антител

Качественный рентгенофазовый анализ (РФА) проводили на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом (Япония). Съёмку проводили в режиме на отражение (геометрия Брегга-Брентано) с использованием СиК α излучения (длина волны l = 1,54183 Å). Анализ полученных рентгенограмм проводили с помощью программы WinXPOW при использовании базы данных ICDD PDF-2.

Растровая электронная микроскопия образцов была произведена на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия).

Инфракрасная (ИК) спектроскопия была произведена на спектрометре BRUKER EQUINOX55. Диапазон съемки — 4000–400 см⁻¹.

Контакты к ITO делали из металлического индия методом пайки. Для проверки омического поведения индиевых контактов были измерены вольтамперные характеристики массива наностержней оксида цинка. Измерения проводили двухконтактным методом при помощи вольтамперметра Keithley Source-Measure Unit (модель 237). Напряжение варьировали от -5 до 5 В с шагом 0,1 В.

3. Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена РЭМ наностержней оксида цинка. Длина наностержней составляет около 2 мкм, толщина — около 50 нм.

Синтез и модификация наноструктур оксида цинка для создания иммуносенсора



РИС. 2. РЭМ наностержней оксида цинка



РИС. 3. Рентгенограмма массива наностержней оксида цинка

Рентгенограмма оксида цинка (рис. 3) показывает, что полученное вещество является хорошо закристаллизованной вюрцитной фазой ZnO. Ярко выраженное выделение пика направления 002 говорит о хорошей вертикальной упорядоченности полученных стержней.

Для демонстрации успешной модификации наностержней ZnO, а также иммобилизации антител на модифицированной поверхности образцы были изучены с помощью ИК-спектроскопии (рис. 4). Широкие пики в области 3400 см⁻¹ отвечают колебаниям OH-групп на поверхности ZnO и наблюдаются на всех спектрах. Отличительной особенностью ИК-спектров после иммобилизации антител являются интенсивные пики в области 1100–1000 см⁻¹, типичные для больших белковых молекул и соответствующие колебаниям C-C связей в кетонных группах и C-O связей в спиртах.



Рис. 4. ИК-спектры массива наностержней ZnO на разных стадиях модификации ТАБЛИЦА 1. Удельное сопротивление устройства на разных стадиях модификации

Структура	ρ , Ом×см
ZnO, дневной свет	71
ZnO, в темноте	74
ZnO, лазер (400 нм)	44
ZnO-APTES	2619
ZnO-APTES-GA	1484
ZnO-APTES-GA-MAb	2208

Линейность ВАХ свидетельствует об омическом характере сопротивления контактов. Сопротивление однородного проводника постоянного сечения зависит от свойств вещества проводника, его длины, сечения и вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\rho L}{S}.$$

Была проведена оценка удельного сопротивления образца ρ при комнатной температуре по формуле:

$$\rho = \frac{U}{jL},$$

где S — площадь сечения, U — прикладываемое напряжение, j — плотность тока, L — длина контактной области. Площадь сечения рассчитывали исходя из ширины контакта d и высоты наностержней h. Исходя из предложенной формулы, можно утверждать, что сопротивление устройства может легко варьироваться с помощью изменения геометрических параметров устройства и длины наностержней.



Рис. 5. ВАХ сенсорного устройства на основе ZnO, (а) немодифицированнвй ZnO при различных условиях измерения, (б) различные стадии модификации

ВАХ массива ZnO были измерены при различных условиях: в темноте, при дневном освещении и под воздействием фиолетового лазера с длиной волны 400 нм (рис. 5а, табл. 1). Под воздействием облучения структура на основе ZnO проявляет значительный эффект фотопроводимости: сопротивление устройства падает более чем в 1,5 раза при облучении фиолетовым лазером. Отметим, что эффект фотопроводимости под воздействием УФ-излучения был ранее описан в литературе [30]. Значительно большую чувствительность проводимость массива наностержней ZnO показала по отношению к модификации поверхности органическими линкерами (рис. 56, табл. 1). После модификации APTES сопротивление устройства вырастает более чем в 30 раз по сравнению с поверхностью чистого ZnO. При последующей модификации с помощью GA и иммобилизации антител удельное сопротивление меняется в пределах 40% от сопротивления ZnO, модифицированного APTES. Такие изменения легко регистрируются с помощью простейшего вольтамперметра и могут быть использованы для детектирования аналитов, меняющих зарядовое состояние системы ZnO–биорецептор.

4. Заключение

Эффективность предложенного метода модификации массива наностержней ZnO была проиллюстрирована данными ИК-спектроскопии и измерениями BAX. Измерения BAX показывают, что проводимость наностержней ZnO весьма чувствительна к состоянию поверхности, а также к облучению светом с длиной волны менее 400 нм. Это определяет большой потенциал 1D структур ZnO в области создания биосенсоров. Манипулирование проводящими свойствами устройств на основе ZnO может осуществляться с помощью допирования, варьирования геометрических размеров стержня и площади массива, что открывает возможности достижения наиболее удобных показателей проводимости для детектирования тех или иных аналитов. Принимая во внимание чрезвычайную простоту измерений BAX, производящихся на недорогостоящем оборудовании, можно говорить о перспективности кондуктометрических устройств на основе ZnO не только для газовых сенсоров, но и для биосенсоров.

Литература

- Clark L.C., Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1962. – V. 102, No. 1. – P. 29–45.
- [2] Zhao Z., Lei W., et al. ZnO-Based Amperometric Enzyme Biosensors // Sensors. 2010. V. 10, No. 2. -P. 1216-1231.
- [3] Пономарева О.Н., Решетилов А.Н., Алферов В.А. Биосенсоры. Принципы функционирования и практическое применение. — Изд-во ТулГУ, Тула, 2007. — 255 с.
- [4] Negahdary M., Asadi A., et al. A Biosensor for Determination of H2O2 by Use of HRP Enzyme and Modified CPE With Zno Nps // International Journal of Electrochemical Science. – 2012. – V. 7, No. 6. – P. 5185–5194.
- [5] Ali S.M., Ibupoto Z.H., et al. Potentiometric Indirect Uric Acid Sensor Based on ZnO Nanoflakes and Immobilized Uricase // Sensors. – 2012. – V. 12, No. 3. – P. 2787–2797.
- [6] Gu B., Xu C., et al. ZnO quantum dot labeled immunosensor for carbohydrate antigen 19–9 // Biosensors & Bioelectronics. – 2011. – V. 26, No. 5. – P. 2720–2723.
- [7] Teng Y., Zhang X., et al. Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of Escherichia coli // Biosensors & Bioelectronics. – 2011. – V. 26, No. 12. – P. 4661–4666.
- [8] Hagen J.A., Kim S.N., et al. Biofunctionalized Zinc Oxide Field Effect Transistors for Selective Sensing of Riboflavin with Current Modulation // Sensors. – 2011. – V. 11, No. 7. – P. 6645–6655.
- Kohler G., Milstein C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity // Nature. - 1975. - V. 256, No. 5517. - P. 495-497.
- [10] Lu X., Bai H., et al. A reagentless amperometric immunosensor for alpha-1-fetoprotein based on gold nanowires and ZnO nanorods modified electrode // Analytica Chimica Acta. – 2008. – V. 615, No. 2. – P. 158–164.
- [11] Ibupoto Z., Jamal N., Khun K., Willander M. Development of a disposable potentiometric antibody immobilized ZnO nanotubes based sensor for the detection of C-reactive protein // Sensors and Actuators B-Chemical. - 2012. - V. 166. - P. 809-814.
- [12] Ahn K.Y., Kwon K., et al. A sensitive diagnostic assay of rheumatoid arthritis using three-dimensional ZnO nanorod structure // Biosensors & Bioelectronics. – 2011. – V. 28, No. 1. – P. 378–385.
- [13] Pearton S.J., Norton D.P., et al. Recent progress in processing and properties of ZnO // Progress in Materials Science. - 2005. - V. 50, No. 3. - P. 293-340.
- [14] Wang Z.L. Nanostructures of zinc oxide // Materials Today. 2004. V. 7, No. 6. P. 26-33.
- [15] Wang Z.L. The new field of nanopiezotronics // Materials Today. -2007. V. 10, No. 5. P. 20-28.
- [16] Ng H.T., Chen B., et al. Optical properties of single-crystalline ZnO nanowires on m-sapphire // Appl. Phys. Lett. - 2003. - V. 82, No. 13. - P. 2023-2025.
- [17] Гаврилов А.И., Капитанова О.О., Баранов А.Н., Чурагулов Б.Р. Особенности гидротермального синтеза ориентированных наностержней оксида цинка на подложке из металлического цинка // Журнал неорганической химии. – 2012. – Т. 57, № 9. – С. 1264–1268.
- [18] Baranov A.N., Panin G.N., Kang T.W., Oh Y.J. Growth of ZnO nanorods from a salt mixture // Nanotechnology. – 2005. – V. 16, No. 9. – P. 1918–1923.
- [19] Cozzoli P.D., Kornowski A., Weller H. Colloidal Synthesis of Organic-Capped ZnO Nanocrystals via a Sequential Reduction-Oxidation Reaction // J. Phys. Chem. B. – 2005. – V. 109, No. 7. – P. 2638–2644.
- [20] Krishnamoorthy S., Bei T., et al. Morphological and binding properties of interleukin-6 on thin ZnO films grown on (100) silicon substrates for biosensor applications // Biosensors & Bioelectronics. - 2006. - V. 22, No. 5. - P. 707-714.
- [21] Yakimova R., Selegard L., et al. ZnO materials and surface tailoring for biosensing // Frontiers in bioscience (Elite edition). - 2012. - V. 4. - P. 254-278.
- [22] Grieshaber D., MacKenzie R., Voeroes J., Reimhult E. Electrochemical biosensors Sensor principles and architectures // Sensors. – 2008. – V. 8, No. 3. – P. 1400–1458.
- [23] Гаврилов А.И., Баранов А.Н., Чурагулов Б.Р., Третьяков Ю.Д. Получение ориентированных наностержней оксида цинка на подложках из металлического цинка гидротермальной обработкой // Доклады Академии Наук Физическая химия. – 2010. – Т. 432, № 4. – С. 486–489.
- [24] Zhao J., Wu D., Zhi J. A novel tyrosinase biosensor based on biofunctional ZnO nanorod microarrays on the nanocrystalline diamond electrode for detection of phenolic compounds // Bioelectrochemistry. - 2009. -V. 75, No. 1. - P. 44-49.
- [25] Xu S., Wang Z.L. One-dimensional ZnO nanostructures: Solution growth and functional properties // Nano Research. - 2011. - V. 4, No. 11. - P. 1013-1098.

Синтез и модификация наноструктур оксида цинка для создания иммуносенсора

- [26] Geistlinger H. Electron Theory of Thin-Film Gas Sensors // Sensors and Actuators B-Chemical. 1993. V. 17, No. 1. – P. 47–60.
- [27] Zhai T., Li L., et al. Recent Developments in One-Dimensional Inorganic Nanostructures for Photodetectors // Advanced Functional Materials. – 2010. – V. 20, No. 24. – P. 4233–4248.
- [28] Неизвестный И.Г. Полупроводниковые нанопроволочные сенсоры // Микроэлектроника. 2009. Т. 38, № 4. – С. 243–259.
- [29] Плахова Т.В., Шестаков М.В., Баранов А.Н. Влияние текстурированных затравок на морфологию и оптические свойства массивов наностержней оксида цинка, синтезированных из раствора и газовой фазы // Неорганические материалы. — 2012. — Т. 48, № 5. — С. 1–8.
- [30] Liao Z.M., Xu J., Zhang J.M., Yu D.P. Photovoltaic effect and charge storage in single ZnO nanowires // Appl. Phys. Lett. – 2008. – V. 93, No. 2. – P. 023111–023113.
- [31] Трошин А.В., Коваленко А.А., Дорофеев С.Г., Баранов А.Н. Сенсибилизация наностержней ZnO квантовыми точками CdSe // Неорганические материалы. — 2012. — Т. 48, № 7. — С. 1–8.

SYNTHESIS AND MODIFICATION OF ZINC OXIDE NANOSTRUCTURES FOR CONDUCTOMETRIC IMMUNOSENSOR DEVELOPMENT

M.A. Shiryaev, A.N. Baranov

Chemistry Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

In present paper zinc oxide nanostructure synthesis and modification for bioanalytical applications are described. Properties of modified zinc oxide array have been studied, and original scheme for conductometric immunosensor has been proposed.

Keywords: zinc oxide, biosensors, nanorods, modification.