

## Technologia i charakteryzacja modyfikowanych struktur ISFET na potrzeby detekcji awidyny

**Streszczenie.** Dzięki dużej specyficzności tworzenia się kompleksu awidyna-biotyna i jego trwałości, awidyna wykorzystywana jest jako sonda molekularna w wielu układach badawczych. Istnieje wiele technik laboratoryjnych stosowanych w celu oczyszczania białek bądź wykrywania i ilościowego oznaczania substancji takich jak peptydy czy przeciwciała, często są jednak one kosztowne i wymagają pełnej uwagi operatora. Celem niniejszej pracy jest określenie możliwości zastosowania ISFET jako czujników służących do wykrywania obecności awidyny.

**Abstract.** Due to the specificity of the formation of the avidin-biotin complex and its stability, avidin is used as a molecular probe in a great deal of research systems. There already exist laboratory techniques used to purify proteins, or to detect and quantify substances such as peptides, antibodies and hormones but they usually require pricy equipment and a full commitment of the operator. The aim of this work is to determine the possibility of using ion-sensitive field-effect transistors (ISFET) as sensors for detecting the presence of avidin. (**Technology of modified structures ISFET for detection of avidin**)

**Słowa kluczowe:** ISFET, czujnik, awidyna, biotyna

**Keywords:** ISFET, sensor, avidin, biotin

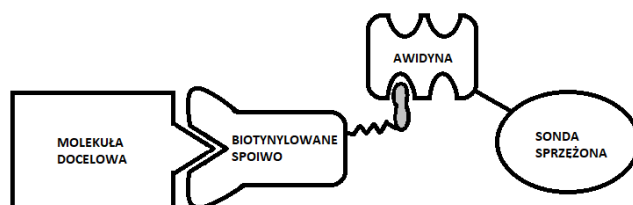
### Wstęp

Ze względu na swoje właściwości awidyna stanowi obiekt szerokich badań biochemicznych. Glikoproteina ta występuje w białku jaja kurzego, co czyni ją ogólnodostępną, a oddziałując z biotyną tworzy jedną z najsilniejszych interakcji niekowalencyjnych występujących w przyrodzie ( $10^6$  razy większe powinowactwo niż przeciwciała do odpowiedniego antygeny). Cząsteczka awidyny posiada cztery miejsca mogące przyłączyć biotynę, tworząc niekowalencyjne wiązanie o wysokim powinowactwie ( $K_a = 10^{15} M^{-1}$ ). Biotyna wykorzystywana jest jako znacznik przeciwciał, hormonów, kwasów nukleinowych, a także enzymów. Substancje biologiczne mogą być nią wyznakowane nawet w 150 miejscach [1] [2], przy czym nie wpływa ona na ich właściwości biologiczne. Dzięki dużej specyficzności tworzenia się tego kompleksu i jego trwałości, awidynę wykorzystuje się jako sondę molekularną w wielu układach badawczych, mających na celu izolację, lokalizowanie i wizualizację różnych antygenów, jak również celowany transport leków i stymulację limfocytów [3]. Jest ona obecnie również szeroko wykorzystywana w biochromatografii, testach diagnostycznych, próbach genowych oraz jako czynnik wychytujący lub blokujący w testach immunologicznych typu ELISA i czynnik wiążący w mikrochipach DNA [4]. Umiejętność oznaczania awidyny umożliwia pośrednią identyfikację innych związków takich jak białka czy antygeny.

System awidyna-biotyna lub streptawidyna-biotyna jest wykorzystywany do wykrywania biotynylowanych (znakowanych biotyna) sond. Podczas oczyszczania białek stosuje się podstawową metodę laboratoryjną polegającą na wykryciu i izolacji wybranego typu protein, wykorzystując na przykład powinowactwo do specyficznych ligandów [5]. Ze względu na trudności w rozróżnieniu konkretnego rodzaju protein w ich złożonej mieszaninie, stosuje się biotynylowane przeciwciała i inne specyficzne sondy nakierowane na wybrany typ białka. Następnie, za pomocą glikoproteiny - awidyny można wykryć wspomniane pierwszo- lub drugorzędowe przeciwciała. Wykorzystuje się przy tym fakt, iż przeciwciała połączają się z białkiem wiążącym biotynę, sprzężonym z fluorescencyjnymi lub enzymatycznymi odczynnikami detekcyjnymi [5].

Stąd kluczowe znaczenie sprawnego oznaczania awidyny. Typowe testy wykorzystujące opisaną metodę to przykładowo: IHC, Westernblot i test ELISA [5]. Techniki te

wymagają zastosowania specjalistycznego, nieraz kosztownego sprzętu oraz czasochłonnej pracy operatora. Wciąż nie została opracowana jeszcze metoda, która byłaby jednocześnie tania, łatwa w zastosowaniu, pozwalałaby na analizę próbek w krótkim czasie z bardzo wysoką czułością przy jednoczesnej automatyzacji procesu. Wszystkie wymienione cechy spełnia potencjalnie metoda wykorzystująca jonoczułe tranzystory ISFET, będące jednymi z najbardziej popularnych systemów do wykrywania substancji biochemicznych, stosowane obecnie szeroko jako czujniki pH w branży spożywczej [7]. Co więcej, zastosowanie metod detekcji opierających się na pomiarze sygnału elektrycznego pozwalają na uzyskanie większych możliwości wbudowania i miniaturyzacji układu detekcyjnego. Parametry elektryczne takie jak pojemność, natężenie prądu, napięcie czy oporność mogą się zmieniać w wyniku rozpoznania antygeny lub sekwencji komplementarnej w badanej próbce.



Rys. 1. Schemat przedstawiający kluczową zasadę działania kompleksu awidyna-biotyna [6]

Celem badań była analiza oddziaływania biotyny, a następnie kompleksu awidyna-biotyna na modyfikowane struktury ISFET, poprzez badanie ich odpowiedzi prądowo-napięciowych przed oraz po zakropleniu związków w obszar bramkowy tranzystora. Miało to na celu ustalenie możliwości zastosowania tranzystorów ISFET do detekcji substancji biologicznych: biotyny i awidyny.

### Materiały i metody Awidyna

Awidyna jest glikoproteina występująca w białku jaj, jest jej tam niewielka ilość (do 0,05% całego białka), występuje również w tkankach ptaków, płazów oraz gadów, co czyni ją łatwą dostępną. Jak wspomniano we wstępie, istnieje duże powinowactwo pomiędzy awidyną i biotyną. W ciągu ostatnich dwóch dekad system awidyna-biotyna znalazł wiele zastosowań w różnych dziedzinach biotechnologii,

biologii i medycyny. Technologia ta opiera się na założeniu, iż biotyna może zostać łatwo przyłączona do większości cząsteczek biologicznych poprzez swój boczny łańcuch kwasu walerianowego, bez istotnej zmiany właściwości biologicznych i fizykochemicznych przyłączanych cząsteczek. Cząsteczka biologicznie czynna jest rozpoznawana przez biotynylowaną substancję, która z kolei wykrywana jest przez awidynę sprzężoną z odpowiednią sondą [5]. Awidyna ma nadzwyczajnie wysoka wartość punktu izoelektrycznego ( $pI \approx 10,5$ ) co oznacza, że posiada ona silny ładunek dodatni. Nawet znaczne modyfikacje chemiczne mają niewielki wpływ na aktywność awidyny, czyniąc ją szczególnie przydatną w procesie oczyszczania białek.

## Biotyna

Biotyna inaczej nazywana witaminą B7 występuje w niewielkich ilościach we wszystkich komórkach żywych. Ponieważ biotyna jest stosunkowo niewielką cząsteczką, może być sprzężana z wieloma białkami bez znaczącej zmiany ich aktywności biologicznej. Białko może reagować z kilkoma cząsteczkami biotyny, z których z kolei każda może wiązać cząsteczkę awidyny. Taka zależność znacznie zwiększa czułość wielu procedur oznaczania. Boczny łańcuch kwasu walerianowego cząsteczki może zostać poddany reakcji derywatacji, tak by możliwe było przyłączenie różnych grup reaktywnych, wykorzystywanych do przyłączania biotyny do innych cząsteczek. Dana cząsteczka, po przyłączeniu biotyny, może być oczyszczona metodą powinowactwa za pomocą unieruchomionej wersji dowolnego białka wiążącego biotynę. Alternatywnie, biotynylowana cząsteczka może zostać unieruchomiona poprzez interakcje z białkiem wiążącym biotynę [8], a następnie użyta do oczyszczania metoda powinowactwa innych cząsteczek, które specyficznie z nią reagują [9].

## ISFET

### Opis eksperymentu

Struktury ISFET zostały zmodyfikowane za pomocą 3-aminopropylotrietoksylanu (APTES) w procesie silanizacji, poprzez chemiczne osadzenie z fazy gazowej. APTES umożliwia kowalencyjne wiązanie organicznego komponentu na tlenkach metali, takich jak  $TiO_2$ ,  $SiO_2$ . Proces ten składał się z kilku etapów. Tranzystory ISFET przemyto w chloroformie i wysuszono w strumieniu azotu. Następnie, próbki umieszczono w eksykatorze nad dwoma małymi pojemnikami, z których jeden zawierał 30  $\mu$ l prekursora silanu (3-aminopropylotrietoksylanu, APTES), a drugi 10  $\mu$ l katalizatora - trietyloaminy - i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 2h w atmosferze argonu. Ostatecznie odczynnik usunięto z eksykatora, a próbki pozostawiono na 48 godzin w atmosferze argonu w celu utwardzenia warstwy silanu.

Po etapie silanizacji kolejnym krokiem było nałożenie na czujniki roztworu biotyny. Przygotowano go w trzech krokach. Początkowo, za pomocą pipety automatycznej należało dodać do probówki z chlorowodorkiem 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC), 1ml wody dejonizowanej i dokładnie wymieszać na wytrząsarce. Kolejnym krokiem było dodanie do biotyny, w celu rozcieńczenia, 1ml PBS i wymieszać na wytrząsarce do probówek. Ostatnim etapem było dodanie otrzymanego roztworu EDC w ilości 10  $\mu$ l, do biotyny w celu aktywacji jej grup karboksylowych i ponowne, dokładne wymieszczenie. Tak przygotowany roztwór należało zostawić na 15 minut, po którym można było zakraplać go na struktury ISFET. Ze względu na wiązanie peptydowe między grupą aminową i karboksylową, biotyna mogła zostać kowalencyjnie

związana z podłożem. Taka warstwa jest specyficzna dla rozpoznawania awidyny. Awidynę (1mg/ml) rozpuszczono w roztworze soli fizjologicznej (PBS) i tak przygotowaną aplikowano na biotynowane struktury ISFET.

Ostateczne pomiary wykonywano w Instytucie Mikroelektroniki i Optoelektroniki Politechniki Warszawskiej. Wykorzystano w nich trzy roztwory. Roztwór z biotyną służył jako czynnik wiążący awidynę. Działanie tej substancji na tranzystory ISFET poddano badaniu, by uwzględnić jej wpływ podczas analizy wyników. Kolejną substancją była docelowa awidyna. Po aplikacji wyżej wymienionych substancji, na każdy z tranzystorów zaaplikowano zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS). Bufor umożliwia utrzymanie stałego pH, a stężenie jonów jest porównywalne do stężenia panującego w ludzkich płynach ustrojowych [8].

## Wyniki

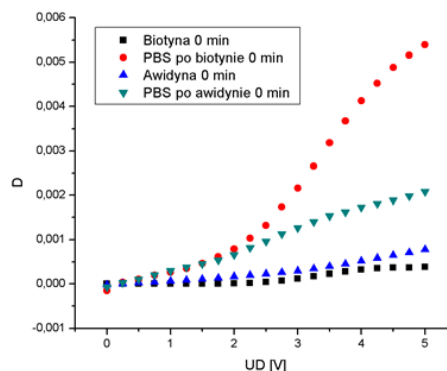
### Próbka sucha - biotyna

Ostatecznie podzielono tranzystory ISFET na grupy, w których zachowanie czujników po aplikacji kolejnych substancji było identyczne pod pewnymi względami. Pod uwagę wzięto tylko te struktury, co do których autor nie miał wątpliwości, iż ich reakcja na zakroplone substancje jest widoczna i umożliwia odróżnienie jej od innych związków.

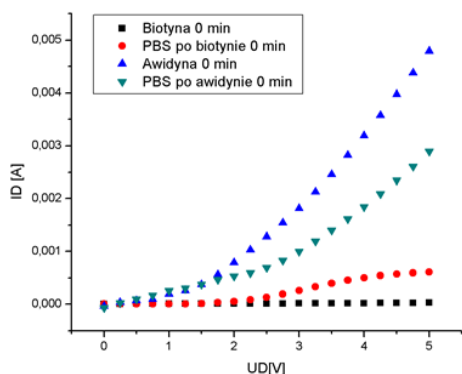
Spośród badanych tranzystorów wyszczególniono cztery grupy:

1. Poziom pomiar sygnału PBS po biotynie osiąga większą wartość prądu niż PBS po awidynie, a awidyna i biotyna charakteryzują się przepływem niższego prądu niż płynący w wyniku zakroplenia po nich PBS.
2. Awidyna powoduje powstanie większego prądu drenu niż PBS dostarczony do obszaru bramkowego po awidynie, przeciwnie zachowanie wykazuje biotyna i zakroplenie PBS po biotynie, natomiast wpływ naniesienia PBS po awidynie skutkuje wyższą wartością prądu niż PBS zakroplony po biotynie.
3. Pomiar prądu w obecności PBS po awidynie wytwarza większy sygnał prądu drenu niż obserwowany w przypadku naniesienia PBS po biotynie, wartości prądów dla PBS po substancjach są większe, niż dla samych substancji.
4. Ostatnią i najliczniejszą grupą tranzystorów są te, w których sygnał awidyny oraz PBS naniesionego po biotynie, osiąga większą wartość niż wartość sygnału w przypadku pomiaru w obecności PBS po awidynie. Zakroplenie PBS i pomiar charakterystyki wyjściowej po biotynie skutkuje wyższym prądem drenu niż zmierzony podczas zakroplonej biotynie.

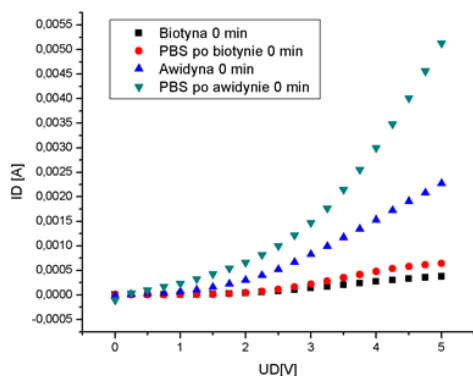
Można podejrzewać, iż jest to grupa docelowa tranzystorów, w których nastąpiło przyłączenie zarówno biotyny do APTES, jak i awidyny do cząsteczek biotyny. Wyjaśniałoby to fakt zwiększonego prądu po "fizycznym" usunięciu awidyny i biotyny, a następnie aplikacji PBSu.



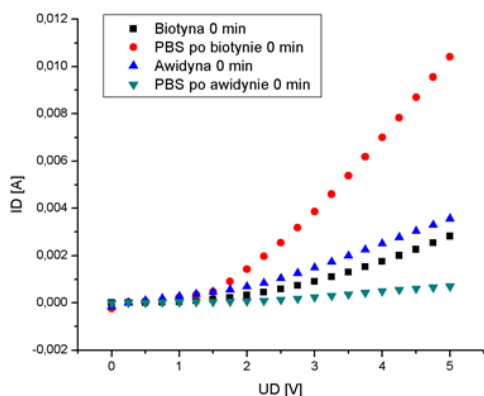
Rys. 2. Pierwszy typ charakterystyk wyjściowych tranzystorów w obecności różnych związków w obszarze bramki.



Rys. 3. Drugi typ charakterystyk wyjściowych tranzystorów w obecności różnych związków w obszarze bramki.



Rys. 4. Trzeci typ charakterystyk wyjściowych tranzystorów w obecności różnych związków w obszarze bramki.



Rys. 5. Czwarty typ charakterystyk wyjściowych tranzystorów w obecności różnych związków w obszarze bramki.

Takie zachowanie tranzystorów może świadczyć o tym, iż nastąpiło związanie biotyny z modyfikowanym obszarem bramki, co objawia się wzrostem prądu po zakropleniu PBS, w stosunku do samej biotyny. Wyższe natężenie prądu po zaaplikowaniu awidyny może z kolei wskazywać na wystąpienie dużego ładunku wniesionego przez ten roztwór. Po oczyszczeniu tranzystora wodą dejonizowaną i aplikacji PBS, wartość prądu spada co może dowodzić, iż wcześniej zakroplonej substancji nie ma w obszarze bramki (nie uległa związaniu i została wmyta).

### Podsumowanie i wnioski

Znaczny procent działających tranzystorów po etapie modyfikacji APTES (94%), świadczy o prawidłowo przeprowadzonym procesie silanizacji.

Najważniejszym wnioskiem, wysnutym na podstawie otrzymanych wyników jest fakt, iż tranzystory

wykazują reakcje na zakroplone związki (awidynę, biotynę oraz PBS po tych substancjach) i zauważalny skok prądu drenu w zerowej minucie od zakroplenia. Problemem, który napotkano podczas pomiarów było niejednoznaczne zachowanie struktur w stosunku do zakroplonych roztworów, uniemożliwiające bezwzględne rozpoznanie konkretnej substancji. W części tranzystorów po zakropleniu biotyny, prąd drenu malał w miarę upływu czasu, natomiast w części rósł.

Bardzo dobre wyniki osiągnięto po zakropleniu PBS po biotynie. W tym przypadku większość tranzystorów zareagowała zwiększonym prądem drenu od razu po zakropleniu soli fizjologicznej, w stosunku do sygnału pochodzącego od samej biotyny, co pozwala stwierdzić, iż nastąpiło przyłączenie biotyny do APTES.

W przypadku badania zachowania struktur w obecności awidyny i PBSu po tym białku, nie udało się uzyskać jednoznacznych wyników. Część struktur reagowała większym prądem na obecność awidyny, a część na obecność PBSu po awidynie, co mimo wszystko pozwala na wykazanie obecności obu substancji w obszarze bramkowym.

Podobnie sytuacja wygląda w przypadku porównania tranzystorów po aplikacji PBS po biotynie oraz PBS po awidynie. W przybliżeniu, połowa z nich reaguje większym prądem dla PBS po awidynie, a pozostałe wykazują wyższy sygnał dla PBS po biotynie.

Na ostateczne wyniki ma wpływ nie tylko sposób przygotowania tranzystorów i zastosowane substancje, ale także liczne etapy będące częścią procedury pomiarowej takie jak na przykład modyfikacja obszaru bramkowego. Znaczna ilość czynników decydująca o wynikach pomiarów sprawia, że proces ten wymaga jeszcze udoskonalenia. Badaniu należałoby poddać znacznie większą ilość struktur. Istotnym elementem, który można wprowadzić jest także zbadanie reakcji tranzystorów na sam PBS, przed aplikacją jakiegokolwiek związku. Pozwoliłoby to stwierdzić jaki sygnał generuje tylko sól fizjologiczna i zweryfikować jej poziom w czasie, po zakropleniu konkretnej substancji. Dzięki temu wiadomo byłoby, czy sygnał ten w czasie dąży do wartości czystego PBS, co oznaczałoby całkowite przyłączenie substancji. Warto byłoby również sprawdzić wpływ warunków atmosferycznych takich jak wilgotność powietrza czy temperatura otoczenia. Ponadto należy rozważyć również inne stężenia awidyny i biotyny. To użyte w badaniach mogło być zbyt duże, co skutkowało przyłączeniem wszystkich możliwych cząsteczek substancji, a pozostałe nieprzyłączone mogły osiąść w obszarze bramkowym i nie zostać zmyte przy pomocy wody dejonizowanej (czyszczenie po aplikacji każdej substancji nie odbywało się mechanicznie, tranzystor był jedynie „opłukiwany”). Mogło to skutkować zmienionymi odczytami po aplikacji kolejnych roztworów.

Podsumowując opisane wyniki można stwierdzić, iż tranzystory ISFET reagują na obecność substancji i pozwalają na wykrycie jej obecności, z częściowym rozróżnieniem na typ (awidyna, biotyna, PBS). Niestety na tym etapie prac, nie można jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy wykrywanie i odróżnienie awidyny i biotyny jest możliwe, aczkolwiek wszystko wskazuje na to, iż po wprowadzeniu pewnych modyfikacji, będzie to wykonalne.

Gdy uda się osiągnąć wystarczającą skuteczność i powtarzalność pomiarów, zastosowanie struktur ISFET do wykrywania awidyny ma szansę stać się jednym z najtańszych i najszybszych sposobów jej detekcji.

**Autorzy:** Kinga Kondracka, Piotr Firek ([piotr.firek@pw.edu.pl](mailto:piotr.firek@pw.edu.pl)), Magdalena Jaworowska, Mariusz Sochacki, Politechnika Warszawska Instytut Mikroelektroniki i Optoelektroniki Koszykowa 75, 00-662 Warszawa

## LITERATURA

1. Helak - Łapaj C., „Metody analizy komputerowej ekspresji reakcji immunohistochemicznej i histochemicznej oraz ocena struktur w badaniach mikroskopowych,” *Rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny*, 2012.
2. Livnah O., et al., „Three-dimensional structures of avidin and the avidinbiotin complex,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, tom 90, pp. 5076-5080, czerwiec 1993.
3. Wilchek M., et al., „The avidin-biotin complex in immunology,” tom 5, nr 2, pp. 39-43, 1984.
4. Gołab K., et al., „Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania,” *Adv Clin Exp Med*, tom 14, nr 5, pp. 1001-1010, 2005.
5. Martilla A., „Engineering of Charge, Biotin-binding and Oligomerization of Avidin:,” *University of JYVASKYLA*, 2002
6. Wilchek M., et al., „Avidin-biotin Technology,” *Academic Press*, tom 184, 1990.
7. Kapica J., „Ocena możliwości zastosowania biosensorów typu ISFET w przemyśle,” *Inżynieria Rolnicza*, tom 8(68), pp. 127-133, 2005.
8. „Roztwory soli fizjologicznej,” [Online]. Available: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/sol-fizjologiczna>. [Data uzyskania dostępu: 13.04.2022].
9. „Thermo Scientific Avidin-Biotin Technical Handbook,” *Thermo Fisher Scientific*, 2009.