

2014–2020 metų Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos 1 prioriteto „Mokslinių tyrimų, eksperimentinės plėtros ir inovacijų skatinimas“ 01.2.2-LMT-K-718 priemonės „Tiksliniai moksliniai tyrimai sumanios specializacijos srityje“

Projekto Nr. 13.1.1-LMT-K-718-05-0015 „Biojutiklis iš nanosluoksniuotų struktūrų SARS-COV2 nustatymui“ veiklos 1.3. rodiklis

Grafeno pagrindu sukurto COVID-19 viruso biojutiklio prototipo aprašymas

Įvadas

Šioje projekto veikloje buvo susitelkta į prototipo ir kitų pagalbinių komponentų, reikalingų šiam prietaisui naudoti, projektavimą ir gamybą. Šis įrenginys buvo sukurtas, derinant komercinius prietaisus ir komponentus, sukurtus šio projekto metu.

Vykdydami 1.3 veiklos užduotį išsamiai suprojektavome visą prietaiso prototipą, tinkamą analizuoti viruso sudėtinių dalių (pvz., spyglio baltymo) koncentracijas. Šis darbas buvo atliekamas naudojant 3D CAD paketą. Į gamybą taip pat buvo įtrauktas 3D spausdintuvu atspausdintas prototipo laikiklio korpusas ir du papildomi korpusai, skirti visos sistemos suspaudimui. Prototipą sudaro: Mikrofluidinė (mikroskystinė) sistema (i); biojutiklis (ii), periferiniai prietaisai (iii) ir matavimų protokolas (iv).

Apibendrinant galima teigti, kad šis projektas apėmė kruopštų projektavimo, gamybos ir kūrimo derinį, siekiant sukurti specialiai COVID-19 viruso analizei pritaikytą analitinį įrenginį. Kiekviename projektavimo ir gamybos etape taikytas moksliskumas užtikrino, kad galutinis įrenginys atitiktų reikalaujamas funkcijas.

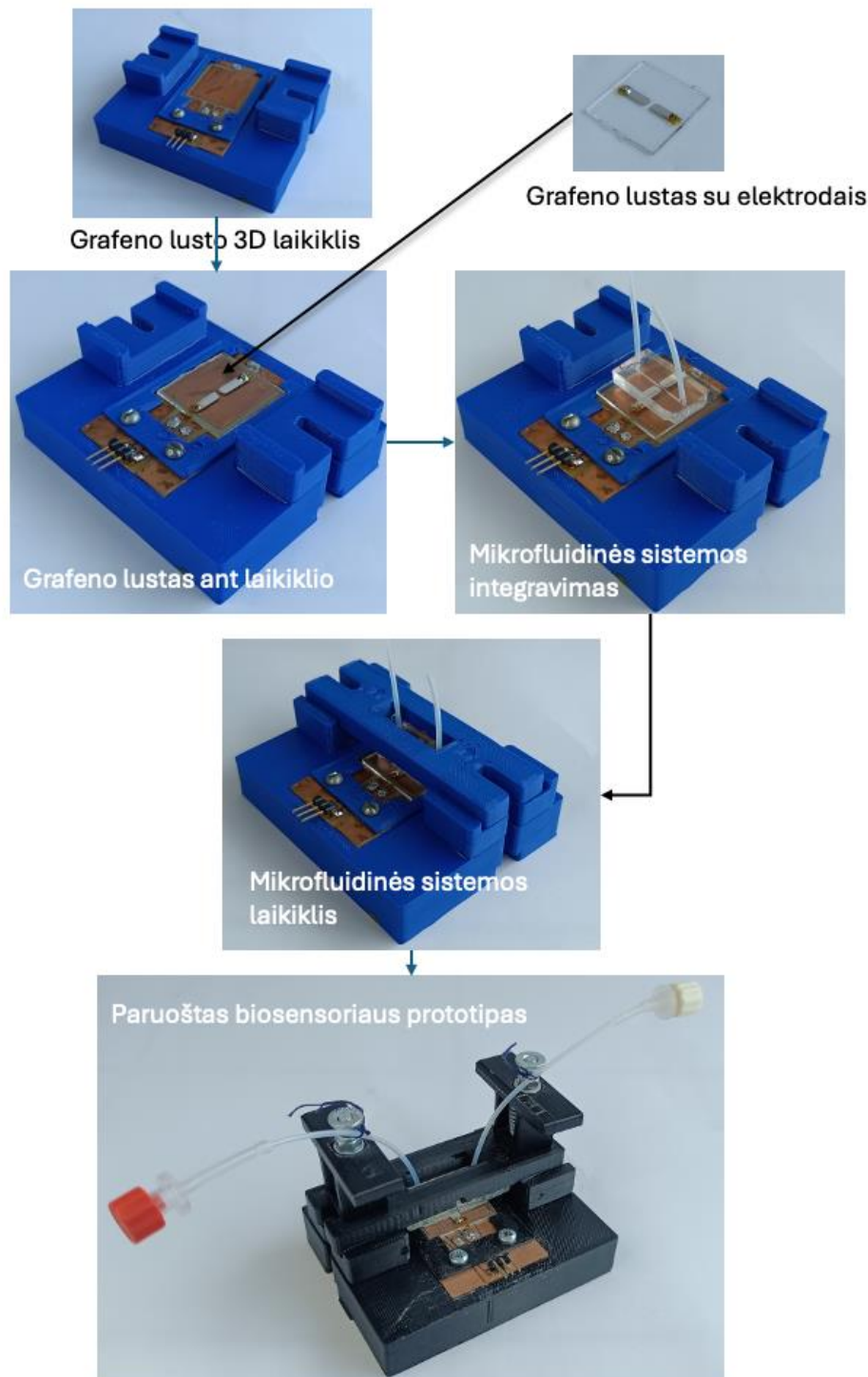
i. Mikrofluidinė sistema ir laikiklio paruošimas

Mikrofluidinė sistema buvo sukurta grafeno jutiklį uždengus specialiai iš anksto paruoštais iš polidimetilsiloksano (PDMS) elementais, turinčiais 0,5 mm pločio ir 3 mm ilgio kanalą. Taigi skysta analizė veikė tik po kanalu esantį grafeną (0,5 mm x 3 mm). Mikroskystinio sistemos elementas buvo paruoštas naudojant pagrindinę liejimo formą. Iš PDMS išlieta forma buvo 8 val. kietinama 60 °C temperatūroje. Tuomet praduriant buvo suformuojami įėjimas bei išėjimas, prie kurių buvo prijungti du lankstūs vamzdeliai. Trečiasis (užtūros) elektrodas buvo suformuotas pradūrus 200 μm skersmens nerūdijančio plieno vielą per elastomero kanalo vidurį (1 pav.).



1 pav. Biojutiklio prototipo mikrofluidinė sistema su įleidimo ir išleidimo vamzdeliais ir užtūros elektrodu.

Sandarumo tarp mikroskysčių sistemos ir grafeno jutiklio užtikrinimui buvo naudojamas 3D spausdintuvu atspausdintas laikiklis. Be to, šis laikiklis turėjo elektrinių jungčių rinkinį, siekiant lengvai prijungti matavimo prietaisus (2 pav.).



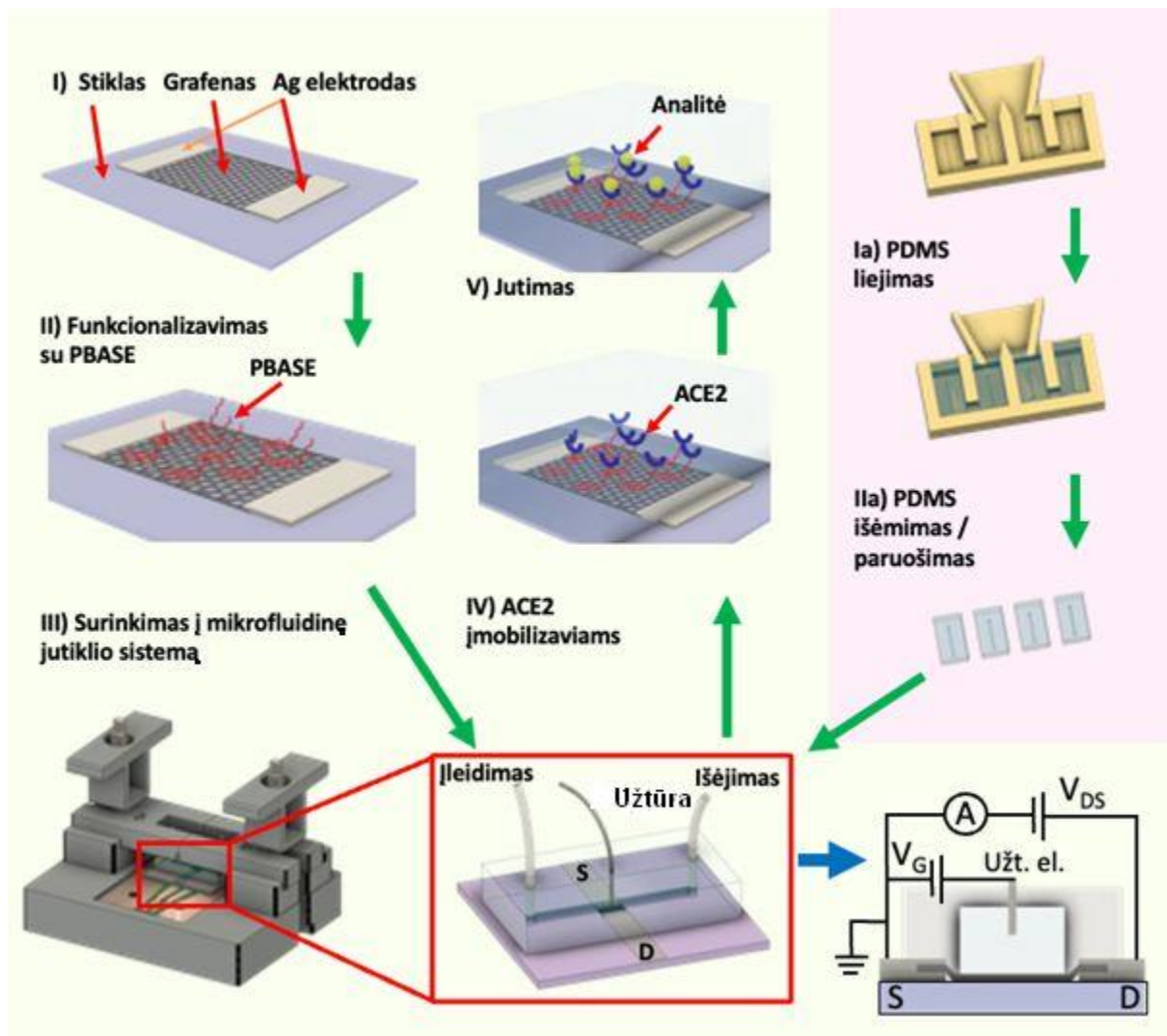
1 pav. Prototipo surinkimo schema.

ii. Biojutiklio paruošimas.

Biojutiklio gamyba prasideda nuo grafeno sluoksnio paruošimo. Tuo tikslu buvo naudojamos dvi skirtingos metodikos: 1) Grafeno auginimas MW-PECVD būdu, 2) jau komerciškai užauginto grafeno pernešimas. Pirmuoju atveju grafeno bandiniai buvo auginami naudojant mikrobangų plazma sustiprinto cheminio nusodinimo iš garų fazės (MW-PECVD) metodą. Kaip padėklas buvo naudota Si(100) plokštelė, padengta 300 nm storio silicio dioksido (SiO₂) sluoksniu. Auginimas buvo vykdomas ant 15x15 mm² dydžio SiO₂/Si padėklo. Po užauginimo buvo paliekamas 3x3 mm² dydžio aktyvusis grafeno plotas. Tuo tikslu iš pradžių per kaukę, naudojant elektronų pluošto garinimą, buvo nusodinta vario plėvelė. Tada neapsaugota grafeno dalis buvo nuėsdinta, naudojant deguonies plazmą. Galiausiai vario kaukė pašalinta cheminiu ėsdinimu. Siekiant sukurti elektrinius kontaktus, du Ag elektrodai buvo nusodinti naudojant magnetroninį dulkinimą. Kontakto storis buvo 250 nm. Elektrodo matmenys buvo 7x3 mm², o atstumas tarp jų - 1,5 mm.

Antrosios metodikos eigoje nupirkta (Graphenea Semiconductor SLU, Ispanija) ant Cu folijos užaugintas grafenas buvo perkeltas ant 1 mm storio stiklinės plokštelės su jau nusodintais Ag kontaktais. Perkėlimas buvo vykdomas naudojant šlapio cheminio ėsdinimo procedūrą. Ag elektrodai su Cr pasluoksniu buvo termiškai nusodinti ant stiklo ir po to 1 valandą atkaitinti 450 °C temperatūroje Ar atmosferoje, taip pagerinant adheziją. Elektrodo konfigūracija buvo tokia pati, kaip ir ankstesniu atveju (MW-PECVD grafenas). Pernešimo procedūros metu Cu folija su grafenu buvo supjaustyta į 3x3 mm² gabalėlius, tada Cu buvo chemiškai ištirpintas naudojant amonio persulfato tirpalą, padedant PMMA/Grafeno/Cu foliją ant skysčio paviršiaus. Po ėsdinimo ant skysčio paviršiaus likdavo plaukioti vienasluoksnio grafeno su PMMA plėvele darinys. Vėliau buvo atliekamas skalavimas dejonizuotu vandeniu, o plūduriuojantis gabalėlis perkeltas ant stiklinio pagrindo (15 mm x 15 mm) su jau esamais Ag kontaktais. Prieš pat grafeno funkcionalizavimą specialiais junginiais, skirtais biojutikliui, PMMA sluoksnis buvo pašalintas naudojant acetoną ir izopropanolį.

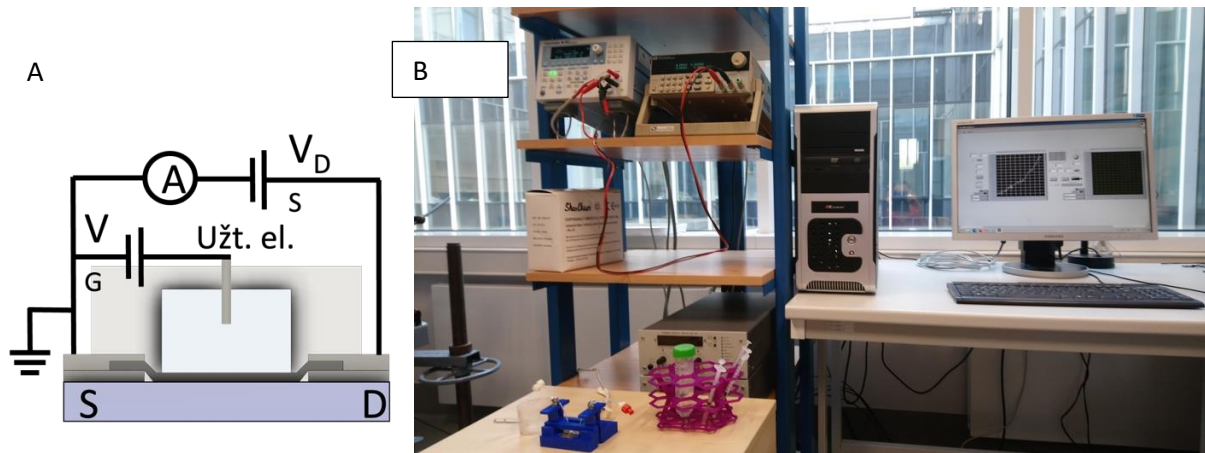
Siekiant pagaminti grafeno pagrindu sukurtą jutiklį, jautrų COVID-19 baltymui (S), pirmiausiai grafeno paviršius buvo funkcionalizuotas. Šiuo tikslu grafeno pagrindu pagaminti elementai buvo vieną valandą kambario temperatūroje mirkomi 1 mM 2,5-dioksiopirolidin-1-il 4-(piren-1-y) butanoato (PBASE) (Cayman Chemical) metanolio tirpale. Po to taip paruošti elementai buvo 8 val. kaitinami 60 °C temperatūroje. Vėliau, ant taip paruošto PBASE/grafeno bandinių paviršiaus buvo uždedama mikroskysčių sistema, kuri leido sukurti lauko tranzistoriaus (FET) su skystu užtūros elektrodu konstrukciją. Pirmiausia PBASE funkcionalizuotas jutiklis buvo veikiamas kelių koncentracijų (nuo 50 ag/ml iki 50 µg/ml) rekombinantinio angiotenziną konvertuojančio fermento (ACE2) (Baltymas, Lietuva) baltymu, paruoštu 0,1x fosfatiniame buferiniame druskos tirpale (PBS). ACE2 perteklius buvo pašalintas skalaujant 1 ml PBS su Tween-20, po to - 2 ml PBS. Tada į mikrofluidinę sistemą buvo įšvirkšta 1 ml PBS su 0,1 % koncentracijos galvijų serumo albumino (BSA), kad būtų užblokuotos ACE2 neuždengtos vietos (3 pav.). Galiausiai buvo atlikti eksperimentai su S spyglio baltymu, kurio koncentracija buvo keičiama nuo 10 ag/ml iki 10 µg/ml.



2 pav. Grefeno paviršiaus funkcionalizavimas ir prototipo elektrinė schema.

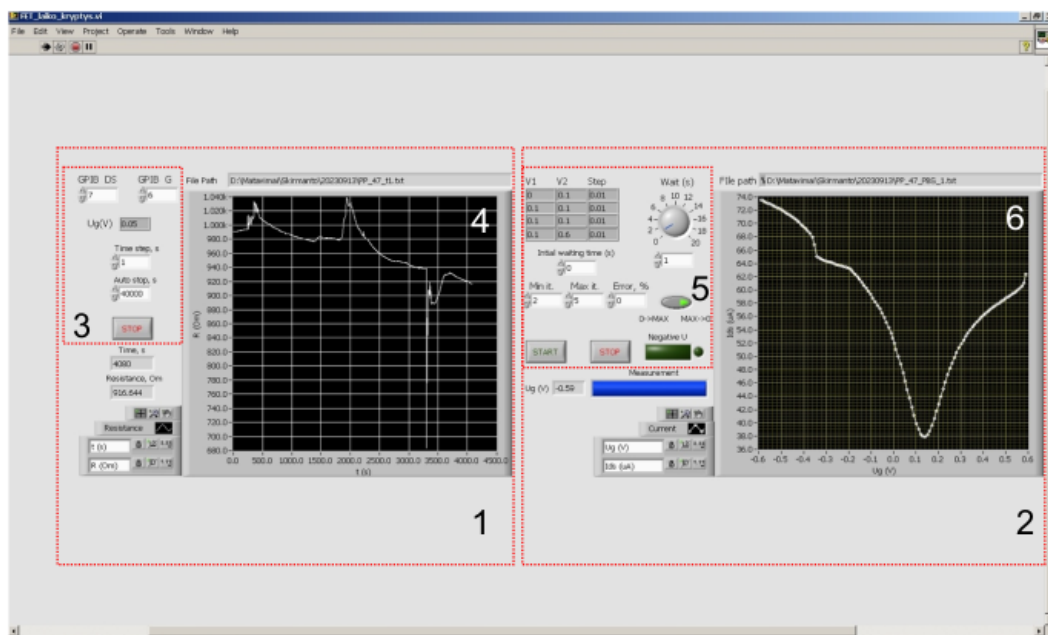
iii. Periferiniai prietaisai ir elektriniai matavimai

Elektrinių charakteristikų matavimo stendo, kuriuo buvo matuojamos FET perdavimo charakteristikos, vaizdas pateiktas 4 pav. Kaip pastovios įtampos šaltinis tarp GFET santakos ir ištakos buvo naudojamas YOKOGAWA GS610 maitinimo šaltinis. Elektrinis laukas tarp užtūros ir ištakos buvo sukuriamas naudojant ITECH IT6123 maitinimo šaltinį (4 pav.).



4 pav. Prototipo matavimo elektrinė schema (A) ir matavimo stendas (B).

GFET perdavimo charakteristikos, t. y. santaka (D) ir ištaka (S) srovės I_{DS} priklausomybė nuo užtūros įtampos V_{GS} , buvo matuojamos išlaikant pastovią 50 mV įtampą V_{DS} . Prieš atliekant perdavimo charakteristikų matavimus, buvo atliekami grafeno kanalo varžos matavimai realiuoju laiku (kinetika). Po kiekvieno grafeno paviršiaus funkcionalizavimo proceso buvo vykdomas 30 minučių laukimo laikotarpis. Šios trukmės pakako, kad įvyktų relaksacijos procesai ir būtų pasiekta varžos soties vertė.

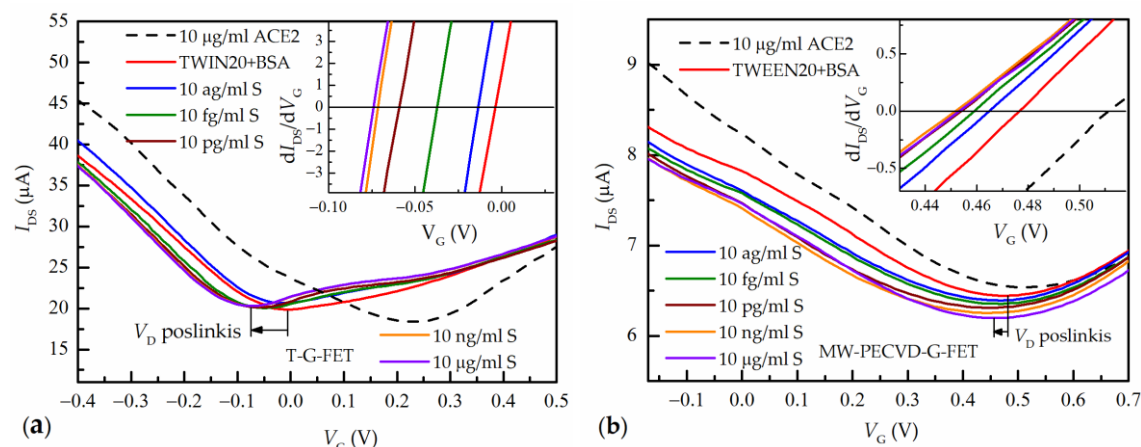


5 pav. Aptarnaujančios programos darbalaukio vaizdas.

Matavimų automatizavimui buvo parašyta programa, kurios darbalaukio vaizdas pateiktas 5 pav. Ji susideda iš dviejų pagrindinių dalių: 1) Varžos laikinės priklausomybės – $R(t)$ valdymo ir matavimo dalies, 2) FET perdavimo charakteristikos – $I_{DS}(V_G)$ valdymo bei matavimo dalies. Parametrų nustatymai bei programos dalių darbo eigos vykdomos per 3 ir 5 numeriu pažymėtuose laukeliuose esančias vartotojo sąsajas. Realaus laiko grafines duomenų atvaizdavimas pateikiamas 4 ir 6 esančiuose grafikuose. Programos darbo eiliškumas sutampa

su anksčiau aprašytu matavimo eiliškumu. Paleidus programą ji pradeda matuoti varžos laikinę priklausomybę. Nusistovėjus procesams yra paleidžiama antroji jos dalis, kuri sustabdo $R(t)$ ir pradeda matuoti $I_{DS}(V_G)$ priklausomybę. Baigus perdavimo charakteristikos matavimą ši dalis yra stabdoma ir toliau tęsiamas $R(t)$ matavimas. Galimybė realiame laike stebėti ir atlikti matavimus smarkiai įtakojo tikslumą, kas įtakojo prototipo jautrumo padidėjimą.

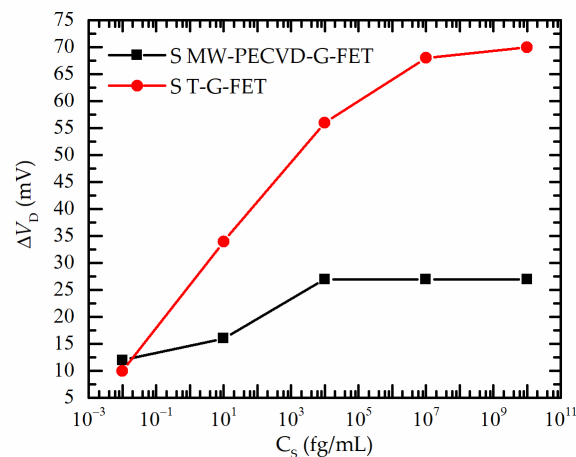
Pagaminius grafeno jutiklį pagal anksčiau aprašytą metodiką, buvo pereita prie jo paruošimo biologinių objektų aptikimui. Pats matavimo procesas buvo vykdomas naudojant tokią metodiką. Jau paruoštas ir prie elektrinės matavimo sistemos prijungtas bei PBASE funkcionalizuotas GFET jutiklis yra užpildomas PBS buferiu. Po 30 min. nusistovėjus varžai yra atliekamas $I_{DS}(V_G)$ charakteristikos matavimas. Šio laiko tarpo užtenka nusistovėti pusiausvyros sąlygoms. Atlikus matavimą vėl yra laukiama 30 min. ir į sistemą yra įleidžiamas mažiausios koncentracijos 10 ag/ml ACE2 tirpalas. Nusistovėjus procesui yra atliekamas $I_{DS}(V_G)$ charakteristikos matavimas, vėliau 30 min. laukimas ir koncentracijos padidėjimas. Žingsniai yra kartojami kol pamatuojamos visos nuo mažiausios – 10 ag/ml iki didžiausios 10 μ g/ml ACE2 koncentracijos. Sekantis etapas – paviršiaus nuplovimas Tween-20, kad pašalinti ACE2 perteklių ir PBASE paviršiaus inaktyvavimas BSA. Paskutinis etapas, pačio Covid-19 spyglio baltymo aptikimas. Jo metu ant jau paruošto paviršiaus (procedūra aprašyta aukščiau) yra įleidžiamas mažiausios koncentracijos – 10 ag/ml S spyglio tirpalas. Palaukiama 30 min. ir vėl matuojama FET perdavimo charakteristika. Visa matavimo metodika tokia pat kaip ir ACE2 atveju bei visi žingsniai kartojami, kol išmatuojamos GFET jutiklio perdavimo charakteristikos pradedant mažiausia – 10 ag/ml ir baigiant didžiausia 10 μ g/ml S spyglio tirpalo koncentracija. Visi žingsniai ir matavimai kartojami tiek užauginto, tiek pernešto GFET jutiklio atvejais. Rezultatai pateikiami 6 pav., o dėl didesnio tikslumo tarpuose pateikiama diferencialinio laidumo priklausomybės nuo užtūros įtampos prie skirtingų S koncentracijų, esant ACE2 koncentracijai 10 μ g/ml.



6 pav. Pernešto T-G-FET (a) ir užauginto MW-PECVD G-FET (b) jutiklių perdavimo charakteristikų priklausomybės, esant skirtingoms S spyglio koncentracijoms.

Pirmiausiai iš 6 pav. galima aiškiai matyti grafenui būdingą $I_{DS}(V_G)$ charakteristiką, kurioje yra minimumas, dar vadinamas Dirako minimumu. Tai galioja abiejų grafeno sluoksnių atveju, tik skiriasi jų minimumų padėtis, ką tik užauginto ir nefunkcionalizuoto grafeno atveju (juoda punktyrinė kreivė): MW-PECVD grafenui $V_D=580$ mV, o perneštam grafenui $V_D=73$ mV.

Dirako įtampos minimumo vieta rodo legiravimo laipsnį. Neapdoroto grafeno legiravimo lygį lemia įvairūs veiksniai, įskaitant grafeno ir kitų medžiagų (pvz., padėklo, elektrodų ir terpės) sąsajos sąveiką ar priemaišų pasiskirstymą šiose medžiagose. Užauginto grafeno atveju tokį didelį V_D poslinkį ant neapdoroto grafeno galima paaiškinti p tipo savilegiravimu, kuris atsiranda atliekant grafeno auginimą ant SiO_2 padėklo. Taigi galima daryti prielaidą, kad padėklo apdorojimas prieš grafeno augimą ir (arba) pats tiesioginis grafeno sintezės procesas lėmė padėklo paviršiaus ar sudėties pokyčius bei teigiamo krūvio perdavimą grafenui. Vėlesnis grafeno aktyvavimas PBASE pastumia jo minimumus abiejų grafeno sluoksnių atveju dar toliau į dešinę, pernešto iki 327 mV, o užauginto – 624 mV. Tai įvyksta dėl to, jog grafenas yra jautrus krūviui ant paviršiaus, o PBASE veikia kaip akceptorinė priemaiša. ACE2 užnešimas ant paviršiaus bei jo koncentracijos didinimas veikia kaip donorinė priemaiša, stumianti V_D į kairę pusę. Pernešto grafeno atveju V_D keičiasi iki didžiausios koncentracijos. Tai rodo, jog dėl pernešto grafeno geresnės kokybės galimas didesnis skaičius vietų, kur galėtų paruošimo metu prisikabinti akseptorius. ACE2 atveju Dirako minimumo pokytis ΔV_D skaičiuojamas nuo paviršiaus aktyvuoto PBASE Dirako įtampos vertės. Spyglio S atveju – nuo BSA paruošto paviršiaus. Užauginto ir pernešto GFET jutiklių Dirako minimumo pokyčio priklausomybės nuo S spyglio koncentracijos yra pateiktos 7 paveiksle.

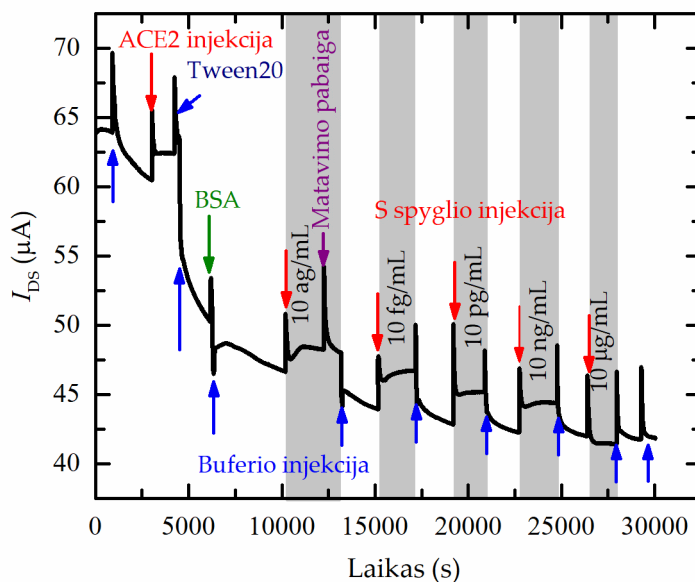


7 pav. Užauginto ir pernešto GFET jutiklių Dirako minimumo pokyčio priklausomybės nuo S spyglio koncentracijos.

Gauti rezultatai demonstruoja, kad nors MW-PECVD būdu išauginto grafeno biojutiklis turi siauresnį jautrumo diapazoną ir žemesnį aptikimo lygį, palyginti su pernešto grafeno biojutikliu, jis gali būti sėkmingai naudojamas SARS-CoV-2 S spyglio baltymui aptikimui. Taip pat iš rezultatų matyti, kad MW-PECVD vis dar gali aptikti dešimčių ag/ml koncentraciją. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus ir grafeno tiesioginio augimo ant Si/SiO₂ paviršiaus suderinamumą su Si technologija, tiesiogiai susintetinto grafeno pagrindu pagamintas FET biojutiklis yra labai perspektyvus, nes gali būti integruotas į skirtingas jutiklių platformas.

iv. Matavimų protokolas

1. Pagal pateiktą grafiką 8 paveiksle, į surinktą prototipo mikrofluidinę sistemą įleidžiamas 0,1x PBS tirpalas ir laukiama kol sistema stabilizuojasi, t.y. nebekinta srovė I_{DS} (pirma mėlyna rodyklė iš kairės). Toliau visos mėlynos rodyklės grafiko apačioje simbolizuoja PBS įleidimą į sistemą.
2. Įleidžiamas ACE2 receptoriaus kiekis „ACE2 injection“ priklausomai nuo pasirinkto eksperimento.
3. Sistema praplaunama dviem tūriais 0,25% TWEEN-20 tipalu 0,1x PBS'e.
4. Potencialiai galimų, laisvų konjugacijai PBASE grupių blokavimui įleidžiamas tūris 0,1xPBS su 1mg/ml BSA.
5. Sistema praplaunama 0,1x PBS (pažymėta grafike „Buferio injekcija“).
6. Leidžiama sistemai nusistovėti, kai įleidžiama pirma mažiausia S baltymo koncentracija, šiuo atveju 10 ag/mL.
7. Nebekintant I_{DS} matavimas stabdomas „Matavimo pabaiga“, sistema praplaunama dviem tūriais ir toliau kartojama procedūra nuo 6 punkto iki didžiausios koncentracijos.



8 pav. Matavimo eigą reprezentuojantis GFET santakos-ištakos srovės kitimo laike grafikas, kai užtūros įtampa lygi 0 V. Rodyklės rodo S spyglio skirtingų koncentracijų įleidimą į mikrofluidinę sistemą.