Ολοκληρωμένος Βιοχημικός Μικροαισθητήρας

Κυριακή Τσαντικίδου
ktsantik@ece.auth.gr

Χρήστος Χουτουρίδης
cchoutou@ece.auth.gr

18 Ιανουαρίου 2020

Περίληψη

Το θέμα που θα παρουσιαστεί σε αυτό το άρθρο είναι ο ολοκληρωμένος βιοχημικός μικροαισθητήρας. Αρχικά, παρατίθενται οι τεχνολογίες-ορόσημα που βοήθησαν στην εξέλιξη αυτής της τεχνολογίας. Έπειτα, επεξηγείται η αρχή λειτουργίας ορισμένων από αυτών έτσι ώστε να γίνουν κατανοητά τα προτερήματα και τα μειονεκτήματα του καθενός. Οι τεχνολογίες που θα παρουσιαστούν είναι τα *ISFET* καθώς και κάποιες παραλλαγές αυτών, τα *ChemFET* και τα *EnzymeFET* , που επίσης έχουν βασιστεί πάνω στην τεχνολογία των *ISFET* . Τέλος, εφόσον αναφερθούν τα γενικά συμπεράσματα όλων των τεχνολογιών αυτών, παρουσιάζεται μια σημαντική εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής η οποία είανι ικανή να ανιχνεύσει το *DNA* ή *RNA* διαφόρων μικροοργανισμών.

1. Εισαγωγή

Η πρώτη επαναστατική τεχνολογία, βάση της οποίας εξελίχθηκαν και όλες οι υπόλοιπες τεχνολογίες που θα παρουσιαστούν παρακάτω, εμφανίστηκε στις αρχές του 1970 και ονομάστηκε ISFET . Την ίδια περίοδο εμφανίστηκαν και αισθητήρια συστήματα βασισμένα σε διακριτά ημιαγωγά υλικά και ηλεκτρόδια, τα οποία προτιμήθηκαν από τα ISFET , καθώς ως τεχνολογίες ήταν ποιο προσιτές στον ιατρικό χώρο, αφού δεν απαιτούσαν ιδιαίτερες γνώσεις μικροηλεκτρονικής ή εξεζητημένες τεχνολογίες παρασκευής. Επομένως, οι πρώτες εφαρμογές των ISFET άρχισαν να εμφανίζονται αρκετά χρόνια αργότερα, στα τέλη της δεκαετίας του 90 και χωρίς να υπάρξει ουσιαστική εμπορική εκμετάλλευση.

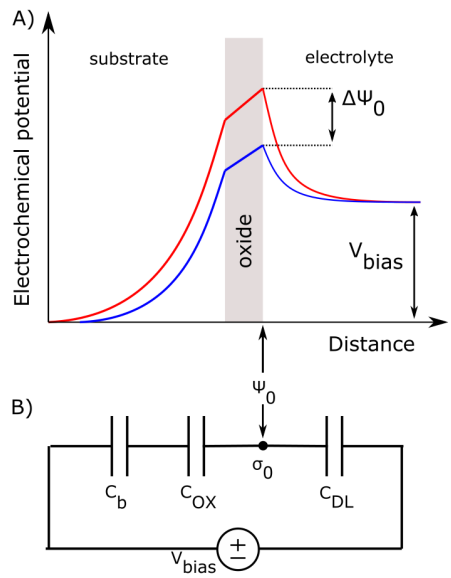
Από τα έτη 2002, 2008 και έπειτα, αρχίζουν και πραγματοποιούνται περισσότερες έρευνες πάνω στην τεχνολογία αυτή με αποτέλεσμα να εμφανιστούν τα ChemFETs και τα EnzymeFETs , το καθένα από τα οποία έχει αντίστοιχα προτερήματα και μειονεκτήματα όμως και τα δύο αποτελούν σημαντική εξέλιξη της τεχνολογίας. Στις αρχές του 2010 άρχισαν να παρουσιάζονται έρευνες οι οποίες εξερευνούσαν παραλλαγές πάνω στην τεχνολογία της πύλης ενός ISFET . Κάποιες από αυτές, είχαν θετικά αποτελέσματα ενώ κάποιες άλλες δεν μπόρεσαν να επιλύσουν τα ήδη υπάρχον προβλήματα. Από το 2015 όμως, ξεκινά η χρήση μικροσκοπικών ηλε-

κτροδίων στην πύλη των FET που σηματοδοτεί και την ανάπτυξη εφαρμογών για την ανίχνευση πρωτεϊνών. Τέλος αξίζει να αναφέρουμε πως μετά το 2010, εμφανίζεται και η τεχνολογία των nanofluidics . Πρόκειται για μηχανολογική κατεργασία σε μικροσκοπικό επίπεδο που σκοπό της έχει να δημιουργήσει ελεγχόμενα κανάλια ροής του προς εξέταση υλικού στον αισθητήρα. Τα nanofluidics , αν και αποτελούν σημαντικό κομμάτι του κλάδου αυτού δεν θα αναλυθούν στο παρόν άρθρο.

2. Τεχνολογίες αισθητήρων

2.1. ISFET

Η έννοια του ion-sensitive FET ή αλλιώς ISFET που παρουσιάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 από τον P. Bergveld [1] βασίστηκε στην τεχνολογία των metal-oxide-semiconductor FET (MOSFET) . Η γενική αρχή του στηρίζεται στην ιδέα ότι ένα MOSFET του οποίου η μεταλλική πύλη έχει αφαιρεθεί και το οποίο έχει βυθιστεί σε ένα διάλυμα, με την παράλληλη χρήση ενός ηλεκτροδίου αναφοράς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει ιόντα. Δεδομένης της σπουδαιότητας των ιόντων υδρογόνου οι αρχικές έρευνες στράφηκαν στην ανίχνευσή του. Στο σχήμα 1 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας. Εδώ το διάλυμα εμφανίζεται ως χωρητικότητα C_{DL}- Double-layer . Το φορτίο σ_0 'βλέπει' χωρητικότητες τόσο προς το FET όσο και προς το διάλυμα. Η διαφορά $\Delta\Psi_0$ παρατηρείται από δύο διαλύματα με διαφορετικό βαθμού ιονισμού. Με αυτό τον τρόπο η μέτρηση του βαθμού ιονισμού ή του pH ενός διαλύματος ισοδυναμεί με τη μέτρηση της χωρητικότητας C_{DL}.



Σχήμα 1: A) Απλουστευμένο μοντέλο μιας ηλεκτροχημικής κυψέλης με οξείδιο ως υλικό διεπαφής. Το φορτίο στην επιφάνεια προκαλεί τη μεταβολή στο δυναμικό $\Delta\Psi_0$
B) Το ισοδύναμο κύκλωμα του μοντέλου του αισθητηρίου, όπου C_{DL}, C_{OX} και C_b είναι οι χωρητικότητες του διαλύματος, του οξειδίου και της περιοχής εξάντλησης αντίστοιχα, όπως περιγράφονται από τους *Shoorideh-Chui* [2].

3. DNA και RNA testing

Τέλος, θα παρουσιαστεί μια εφαρμογή ενός ολοκληρωμένου βιοχημικού μικροαισθητήρα πάνω σε τεχνολογία CMOS . Αυτός χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του DNA ή RNA παθογόνων μικροοργανισμών όπως Influenza A, Influenza B, Polio και διαφόρων άλλων ιών. Ο μικροαισθητήρας αυτός χρησιμοποιεί έναν ΣΔ current-sensing modulator ως ανιχνευτή και μια reverse-biased CMOS diode ως μετατροπέα φωτονίων σε ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια θα γίνει αναλυτικότερη εξήγηση της αρχής λειτουργίας του κυκλώματος εφόσον πρώτα παρουσιαστεί η γενική αρχή λειτουργίας ανίχνευσης μικροορ-

γανισμών.

Η γενική αρχή λειτουργίας τέτοιου είδους μιρκοαισθητήρων προϋποθέτει την ύπαρξη μιας μεμβράνης στην πύλη πάνω στην οποία βρίσκονται ακινητοποιημένοι ανιχνευτές (probes). Αυτοί οι ανιχνευτές δεσμεύουν τον μικροοργανισμό που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και τον ακινητοποιούν σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία. Στο διάλυμα μέσα στο οποίο θέλουμε να ανιχνεύσουμε κάποιον μικροοργανισμό τοποθετούμε ορισμένα φθορίζοντα μόρια τα οποία αντιδρούν χημικά με τον μικροοργανισμό και ενώνονται στην άκρη του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, σε κάθε μικροοργανισμό να υπάρχει αυτή η ταμπέλα (φθορίζον μόριο) στην οποία όταν προσπέσει συγκεκριμένη συχνότητα φωτός, να αρχίσει και αυτή να εκπέμπει κάποιο φως το οποίο μπορεί να ανιχνευτή από μια φωτοδίοδο. Επομένως, αν φωτίσουμε το συγκεκριμένο σημείο στο οποίο υπάρχουν οι ακινητοποιημένοι ανιχνευτές ανάλογα με το φως που θα εντοπίσει η φωτοδίοδος μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ύπαρξη καθώς και για την περιεκτικότητα στο διάλυμα του προς ανίχνευση μικροοργανισμού.

Για την υλοποίηση αυτής της όλης διαδικασίας πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Αρχικά θα πρέπει το στρώμα του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) να έρχεται σε επαφή με το υδατικό δείγμα. Επίσης, θα πρέπει να επικρατεί μια θερμική σταθερότητα η οποία είναι αναγκαία για την επιτυχή πραγμάτωση των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μέσα στο διάλυμα. Η μέγιστη πυκνότητα των ανιχνευτών είναι η τελευταία προϋπόθεση που πρέπει να πληρείται και είναι 6 με 9 nm .

Επιστρέφοντας στην ανάλυση της συγκεκριμένης εφαρμογής, στη συνέχεια θα εστιάσουμε στην υλοποίηση του ολοκληρωμένου. Το ολοκληρωμένο αποτελείται από επίπεδα στρωμάτων και το συνολικό ολοκληρωμένο έχει μέγεθος 100 μ m . Στο πρώτο πάνω στρώμα υπάρχουν ακινητοποιημένοι οι ανιχνευτές που δεσμεύουν τους μικροοργανισμούς του διαλύματος που εξετάζουμε. Στο αμέσως κάτω στρώμα υπάρχει ένα φίλτρο που φιλτράρει το φως που εκπέμπουν τα φθορίζον μόρια έτσι ώστε να μπορεί να εντοπίζεται πιο εύκολα από την φωτοδίοδο. Στο πιο κάτω επίπεδο, υπάρχει ένας heater με τον οποίο επιτυγχάνεται η θερμική σταθερότητα που αναφέρθηκε πιο πάνω. Επίσης, με την βοήθεια του heater μπορούμε να ελέγχουμε την θερμοκρασία και επομένως να επιτύχουμε διάφορες χημικές αντιδράσεις που ενεργοποιούνται λόγω των εναλλαγών αυτών, πράγμα που θα το δούμε στη συνέχεια. Έπειτα, υπάρχουν οι μεταλλικές διασυνδέσεις και στο τέλος υπάρχει η φωτοδίοδος και ο ΣΔ modulator (ο ανιχνευτής). Ουσιαστικά, το φως που εκπέμπεται από τις ταμπέλες των μικροοργανισμών φτάνει μέχρι το τελευταίο επίπεδο που βρίσκεται η φωτοδίοδος και εκεί γίνεται η διαδικασία της μετατροπής του αναλογικού σήματος (συχνότητα φωτός) σε ψηφιακό σήμα.

Στη συνέχεια αναλύεται το κύκλωμα του ανιχνευτή. Όπως έχει προαναφερθεί υπάρχει ένας πρώτης τάξης ΣΔ current-sensing modulator , ο οποίος αποτελείται από έναν ολοκληρωτή (Σ operator) και έναν Αναλογικό σε Ψηφιακό Μετατροπέα (Αναλογ – Διγιταλ ὀνερτερ). Επίσης, ο βρόχος κλείνει με έναν Ψηφιακό σε Αναλογικό Μετατροπέα (Digital – Analog Converter), ο οποίος είναι ο Δ operator και επιστρέφει πίσω σήμα που χρειάζεται για την σωστή μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό σήμα. Το

σημαντικό είναι πως αυτό το κύκλωμα δέχεται ως είσοδο το αναλογικό σήμα της φωτοδιόδου και επιστρέφει μια ψηφιακή έξοδο που μπορεί να διαβαστεί και να οδηγήσει σε ανάλογα αποτελέσματα.

Παρακάτω εξηγείται αναλυτικά η διαδικασία ανίχνευσης των μικροοργανισμών. Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής εναλλάσσουμε την θερμοκρασία με την βοήθεια του heater και έτσι επιτυγχάνεται η πολλαπλή αντιγραφή του DNA ή RNA του μικροοργανισμού που βρίσκεται στο διάλυμα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) και αντιγράφει το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού μέχρι και 2^{30} φορές. Εδώ πρέπει να αναφερθεί πως στη συγκεκριμένη εφαρμογή ακολουθείται μια αντίστροφη διαδικασία από την γενική που αναλύθηκε παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, το φθορίζον μόριο βρίσκεται στην άκρη του ακινητοποιημένου ανιχνευτή και εκπέμπει συνεχώς φως. Επιπλέον, μέσα στο διάλυμα υπάρχουν συγκεκριμένα μόρια (primers) τα οποία όταν πλησιάσουν τα φθορίζον μόρια του ανιχνευτή προκαλούν την προσωρινή ελάττωση του φωτός που εκπέμπεται. Η διαδικασία της δέσμευσης πραγματοποιείται εφόσον σταθεροποιήσουμε την θερμοκρασία λίγο πιο κάτω από τους 60° C .

Για να επιτευχθεί η ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών μικροοργανισμών μέσα στο διάλυμα χρησιμοποιούνται πολλοί μικροαισθητήρες 100μ m που αναλύθηκαν πιο πάνω. Πιο συγκεκριμένα, στην εφαρμογή που αναλύεται, χρησιμοποιούνται 32 x 32 μικροαισθητήρες (32x32 array), ο καθένας από τους οποίους περιέχει διαφορετικούς ανιχνευτές (probes) οι οποίοι δεσμεύουν διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Εφόσον τα μόρια (primers) ενωθούν στη μία άκρη του κάθε αντίγραφου του γενετικού υλικού που έχουν δημιουργηθούν και καθώς διανύουν όλα τα 32ξ32 κουτάκια με τους διαφορετικούς μικροαισθητήρες, δεσμεύονται από τους κατάλληλους ανιχνευτές και ακινητοποιούνται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στο συγκεκριμένο κουτάκι να ελαττώνεται η συχνότητα φωτός που εκπέμπεται. Επομένως, γνωρίζοντας ποιος μικροοργανισμός θα έπρεπε να δεσμεύεται θεωρητικά σε κάθε κουτάκι και αντίστοιχα εξετάζοντας αν έχει μειωθεί η συχνότητα φωτός μέσω της φωτοδιόδου του καθενός κουτιού, επιτυγχάνεται η ανίχνευση του μικροοργανισμού.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σύλληψης, πραγματοποιείται μια αντίστροφη διαδικασία μέσω της οποίας μπορούμε να επιβεβαιώσουμε τα συμπεράσματα στα οποία φτάσαμε. Ειδικότερα, κάθε ένωση μεταξύ ενός ανιχνευτή και του γενετικού υλικού του κάθε μικροοργανισμού έχει μια μοναδική καμπύλη τήξης (melt curve), κατά την οποία ο αντίστοιχος μικροοργανισμός απομακρύνεται από τον ανιχνευτή που τον έχει δεσμεύσει και η φωτοδίοδος συνεχίζει να δέχεται ως είσοδο το φως που εκπέμπεται από το φθορίζον μόριο του ανιχνευτή. Έτσι, αξιοποιώντας την μοναδικότητα αυτή μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε ένα από τα κουτάκια εξετάζοντας την καμπύλη τήξης κατά την οποία άρχισε η φωτοδίοδος να ανιχνεύει πάλι φως. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της θερμοκρασίας από τους 55° C μέχρι τους 95° C και έτσι ουσιαστικά δημιουργείται μια συνεχόμενη καμπύλη τήξης κατά την οποία σε διαφορετικές χρονικές στιγμές οι αντίστοιχοι μικροοργανισμοί θα αποδεσμεύσουν τους ανιχνευτές.

4. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα αυτής της έρευνας είναι πως η χρήση των ολοκληρωμένων βιοχημικών μικροαισθητήρων θα βελτιώσει με πολλούς τρόπους τον τομέα της υγείας και κυρίως την ζωή των ανθρώπων και την δυνατότητα

Αναφορές

[1] P. Bergveld, “Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements,” IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. BME-17, issue 1, pp. 70-71, Jan. 1970.

[2] Shoorideh, K., Chui, C.O., "On the origin of enhanced sensitivity in nanoscale fet-based biosensors,". Proc. Natl. Acad. Sci, vol. 111, pp. 5111–5116, Apr. 8 2014.