

## زیست حسگرهای بر پایه طیف سنجی تبدیل فوریۀ تداخل بازتابی از بستر سیلیکن متخلخل - مبانی نظری و نتایج تجربی

فرشته رحیمی

بخش نانویوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

پست الکترونیکی: rahimi.f@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۲۹؛ دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۹/۰۸/۰۷)

### چکیده

زیست حسگرهای بر روی بستر سیلیکن متخلخل که بر پایه طیف سنجی تبدیل فوریۀ تداخل بازتابی کار می کنند، به دلیل عدم استفاده از برچسب مورد توجه ویژه ای قرار گرفته اند. در این روش، نور بر سطح سیلیکن متخلخل تابانیده شده و طرح تداخلی از تمامی پرتوهای بازتاب شده از سطوح، ثبت می شود. بعد از این که سطح سیلیکن متخلخل در معرض آنالیت زیستی قرار گرفت، آنالیت بسته به اندازه اش، بر روی سطح لایه، یا با نفوذ به درون حفره ها بر روی دیواره آنها جذب می شود. این پدیده، باعث تغییر به ترتیب در ضریب شکست فصل مشترک سطح سیلیکن متخلخل با محیط پیرامون و ضریب شکست لایه سیلیکن متخلخل می شود. در نتیجه، به ترتیب کاهش در شدت قله تبدیل فوریۀ طرح تداخلی یا جابه جایی در مکان آن مشاهده می شود که می تواند معیاری برای سنجش های زیستی باشد. در این مقاله، ابتدا پایه های نظری طیف سنجی تبدیل فوریۀ تداخل بازتابی مورد بحث قرار گرفته است. سپس جزئیات تجربی استفاده از این روش بر روی بستر سیلیکن متخلخل اصلاح شده توضیح داده شده است. در نهایت داده های تجربی حاصل از این روش برای تشخیص پروتئین استوکلسین، قطعه ای از ژن *VKORC1* و باکتری ای-کلائی ارائه شده است.

**واژه های کلیدی:** طیف سنجی تبدیل فوریۀ تداخل بازتابی، لایه فابری- پرو، سیلیکن متخلخل، زیست حسگر

### ۱. مقدمه

سلولی است. این حسگرها می توانند کاربردهای گسترده ای مانند ردیابی عوامل میکروبی در نمونه های زیستی و مواد غذایی، تشخیص متابولیت های دخیل در بیماری های عفونی و غیر عفونی به ویژه سرطان و کنترل بیماری در طول درمان داشته باشند. همچنین می توانند در زمینه داروپژوهی، تحقیقات بیان ژن، حفاظت و نظارت بر محیط زیست، ضد بیوتروریسم و امور نظامی مورد استفاده قرار گیرند.

زیست حسگرها<sup>۱</sup> نوع خاصی از دستگاه های اندازه گیری هستند که برای سنجش و یا ردیابی یک مولکول زیستی خاص در مخلوطی از مواد زیستی به کار می روند. هدف نهایی و اساسی زیست حسگرها ردیابی ترکیبات و یا تغییرات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی دخیل در فرایندهای زیستی در سطح مولکولی یا

<sup>۱</sup>. Biosensors

[۲۱]، بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها [۲۲]، اندازه‌گیری تغییر pH محیط [۲۳]، تشخیص مولکول‌های گاز و سایر مولکول‌های شیمیایی [۲۴] و همچنین مطالعه رهایش کنترل شده داروها [۲۵] مورد استفاده قرار گرفت. در این مقاله، بر آن هستیم که ابتدا مبانی نظری این روش را مورد بررسی قرار دهیم و سپس تشخیص چند جزء زیستی را با این روش مرور کنیم.

## ۲. مبانی نظری

لایه فابری-پرو لایه‌ای است که از دو سطح موازی هم و با ضریب شکستی متفاوت از محیط پیرامون تشکیل شده است. حال اگر موجی به این لایه تابیده شود، امواج بازتاب شده از دو سطح آن با هم تداخل خواهند کرد [۲۶] که به این پدیده، تداخل بازتابی گویند و اگر از این پدیده به منظور طیف‌سنجی استفاده کنیم، آن را طیف‌سنجی تداخل بازتابی می‌نامیم که می‌توان از آن در روش‌های تشخیصی استفاده کرد.

حالت خاصی از طیف‌سنجی تداخل بازتابی را می‌توان بر روی لایه‌های متخلخلی مانند آلومینای متخلخل<sup>۳</sup> یا سیلیکن متخلخل انجام داد. به عنوان مثال، سیلیکن متخلخل را که با ایجاد تخلخل بر روی قطعه‌ای از یک ویفر سیلیکن به وجود می‌آید [۹ و ۱۵] در نظر بگیرید (شکل ۱). ضریب شکست این لایه را می‌توان از تقریب براگمن محاسبه کرد [۲۷]:

$$P \frac{n_r^2 - n_f^2}{n_r^2 + 2n_f^2} + (1 - P) \frac{n_r^2 - n_f^2}{n_r^2 + 2n_f^2} = 0, \quad (1)$$

در این رابطه  $P$  تخلخل نسبی (نسبت حجم سیلیکن خورده شده به حجم کل لایه متخلخل)،  $n_r$  ضریب شکست محیط پرکننده تخلخل‌ها (محیط پیرامون)،  $n_f$  ضریب شکست سیلیکن و  $n_l$  ضریب شکست متوسط لایه متخلخل است.

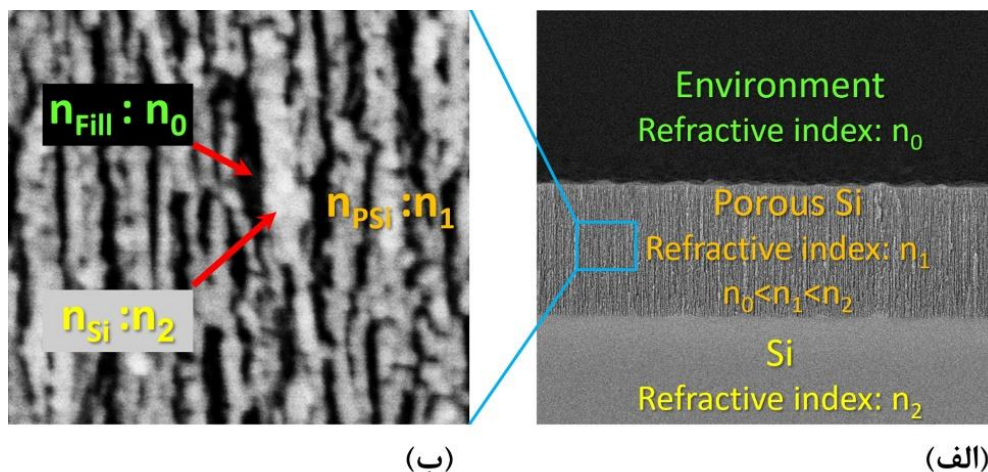
در بین زیست‌حسگرها، زیست‌حسگرهای نوری به دلیل دارا بودن خواصی مانند حساسیت بالا، دقت زیاد، به صرفه بودن (مصرف ماده کم)، کارکرد سریع و آسان، بسیار مورد توجه بوده‌اند [۱-۳]. همچنین این دسته از زیست‌حسگرها از تداخل با امواج الکترومغناطیسی در امان هستند و می‌توان آنها را برای تشخیص‌های از راه دور مورد استفاده قرار داد. در حالت کلی، دو پروتکل تشخیصی در زیست‌حسگرهای نوری وجود دارد. تشخیص بر پایه اندازه‌گیری فلورسانس و تشخیص برچسب<sup>۱</sup>. در روش اندازه‌گیری فلورسانس، مولکول هدف (آنالیت) یا مولکول شناساگر زیستی به یک مولکول دارای خاصیت فلورسانس اتصال می‌یابد (برچسب می‌خورد). پس از اتصال مولکول هدف با مولکول شناساگر زیستی، شدت اندازه‌گیری شده فلورسانس، نشانگر حضور مولکول هدف و قدرت برهمکنش بین این دو مولکول است. گرچه این روش، حساسیت زیادی دارد، اما مراحل برچسب‌زنی، پرهزینه و زحمت‌دار است و همچنین احتمال تغییر عملکرد زیست‌مولکول را به همراه دارد. در مقابل، در روش بدون برچسب هزینه کاهش می‌یابد، مراحل کار ساده تر می‌شود؛ همچنین مولکول زیستی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و در حالت طبیعی خود، شناسایی می‌شود [۴]. بنابراین امروزه در طراحی زیست‌حسگرها، توجه ویژه‌ای به استفاده از روش‌های بدون برچسب وجود دارد.

از بین روش‌های نوری بدون برچسب، روش طیف‌سنجی تداخل بازتابی بر روی پایه سیلیکن متخلخل، روشی است که برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ برای تشخیص مولکول DNA از آن استفاده شد [۵]. اما در سال‌های بعد، این روش توسعه یافت و با استفاده از تکنیک تبدیل سریع فوری، استخراج اطلاعات از آن با دقت بسیار بیشتر برای تشخیص DNA [۶-۹]، تشخیص پروتئین [۱۰-۱۱]، تشخیص باکتری [۱۲-۱۴]، تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در ژن [۱۵]، مطالعه برهمکنش دارو با غشای سلول [۱۶ و ۱۷]، مطالعه برهمکنش لیگاند-گیرنده<sup>۲</sup> [۱۸-۲۰]، مطالعه نحوه عملکرد پروتئین‌های غشایی سلول

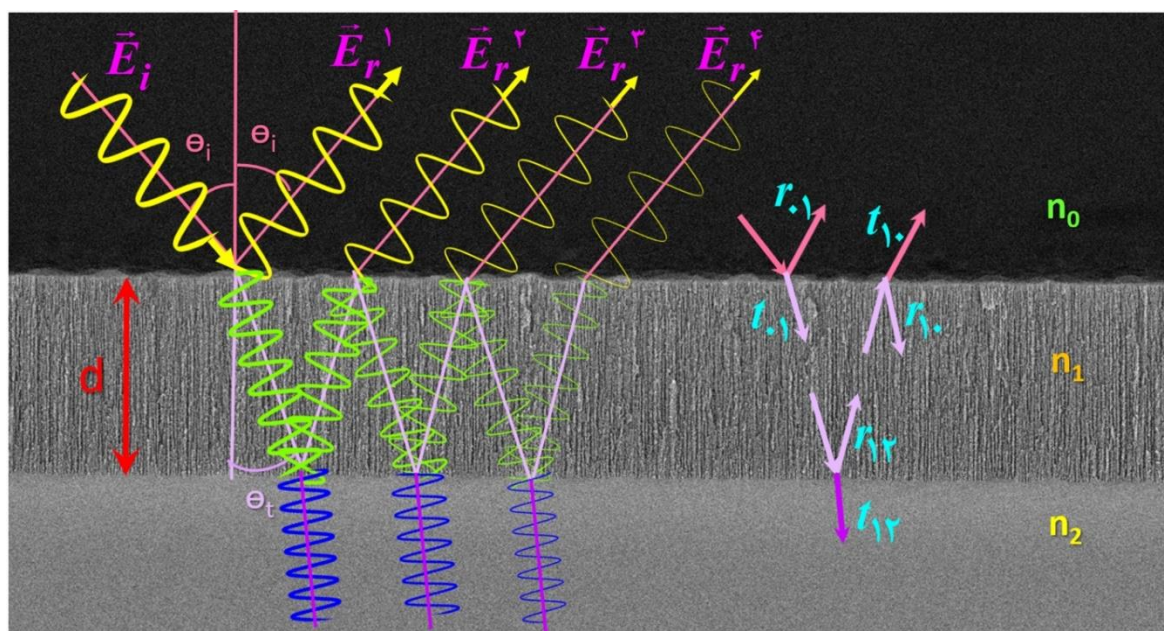
۱. Label-free

۲. Ligand-Receptor

۳. Anodic aluminum oxide (AAO)



شکل ۱. (الف) مقطع عرضی لایه سیلیکن متخلخل بر روی بستر سیلیکن به عنوان لایه فابری- پرو و (ب) قسمتی از لایه با بزرگنمایی بیشتر و ضرایب شکست هر جزء.



شکل ۲. مقطع عرضی لایه سیلیکن متخلخل بر روی بستر سیلیکن به همراه طرحواره‌ای از نحوه بازتاب پرتو از سطوح مختلف لایه.

برای سادگی در این شکل، تنها مؤلفه‌های موازی میدان الکتریکی با صفحه تابش در نظر گرفته شده‌اند. اما این پدیده برای مؤلفه‌های عمود بر صفحه تابش نیز وجود دارد. البته بازتاب‌ها و عبورهای متوالی، در صورتی قابل توجه خواهند بود که دو سطح لایه، زبری اندکی داشته باشند و مقدار عمده بازتاب به صورت آینه‌ای رخ دهد [۹].

رابطه فوق نشان می‌دهد که ضریب شکست لایه متخلخل، بسته به میزان تخلخل، مقداری بین ضریب شکست محیط پیرامون و ضریب شکست سیلیکن خواهد داشت و بنابراین این لایه مانند یک لایه فابری- پرو رفتار خواهد کرد.

حال اگر پرتو نور تک‌فامی ( $\vec{E}_i$ ) با طول موج  $\lambda$  بر سطح لایه سیلیکن متخلخل بتابد، پدیده‌های بازتاب و عبور متوالی مطابق آنچه در شکل ۲، دیده می‌شود، رخ خواهد داد [۲۶].

بنابراین، در تابش عمودی می‌توان رابطه (۲) را به صورت ساده‌تر زیر بازنویسی کرد:

$$\begin{aligned} E_r^1 &= r_o E_i, \quad E_r^2 = (1 - r_o^2) r_1 \exp(-r_1 \delta_d) E_i, \\ E_r^3 &= (1 - r_o^2) r_1^2 (-r_o) \exp(-r_1 \delta_d) E_i, \\ E_r^4 &= (1 - r_o^2) r_1^2 (-r_o) \exp(-r_1 \delta_d) E_i, \end{aligned} \quad (6)$$

بدین ترتیب، مقدار بزرگی میدان الکتریکی موج بازتاب شده را می‌توان به صورت زیر محاسبه کرد:

$$\begin{aligned} E_r &= r_o E_i + (1 - r_o^2) r_1 \exp(-r_1 \delta_d) \times \\ &\quad \left[ 1 - r_1 r_o \exp(-r_1 \delta_d) + (r_1 r_o \exp(-r_1 \delta_d))^2 - \dots \right] E_i, \end{aligned}$$

با توجه به رابطه سری هندسی  $\left( \sum_{n=0}^{\infty} r^n = \frac{1}{1-r} \right)$  می‌توان رابطه (۷) را به صورت زیر بازنویسی کرد:

$$\begin{aligned} E_r &= r_o E_i + (1 - r_o^2) r_1 \exp(-r_1 \delta_d) \times \\ &\quad \times \left[ \frac{1}{1 + r_1 r_o \exp(-r_1 \delta_d)} \right] E_i \\ &= \frac{r_o + r_1 \exp(-r_1 \delta_d)}{1 + r_1 r_o \exp(-r_1 \delta_d)} E_i, \end{aligned} \quad (8)$$

بنابراین چگالی شار بازتابیده به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$I_r = \frac{E_r E_r^*}{r} = \frac{r_o^2 + r_1^2 + 2r_o r_1 \cos(r \delta_d)}{1 + r_1^2 r_o^2 + 2r_1 r_o \cos(r \delta_d)} \frac{E_i^2}{r},$$

با توجه به این که ضرایب بازتاب فرنل از واحد کوچکترند، با تقریب خوبی می‌توان از جملات  $r_1^2 r_o^2$  و  $r_1^2 r_o$  در مقایسه با واحد صرف نظر کرد. بنابراین رابطه اخیر با تقریب خوبی به صورت زیر درمی‌آید:

$$I_r = \frac{E_r E_r^*}{r} = (r_o^2 + r_1^2 + 2r_o r_1 \cos(r \delta_d)) \frac{E_i^2}{r},$$

با توجه به رابطه (۳)، می‌بینیم که محاسبه بازتابندگی برای هر دو حالت مؤلفه میدان الکتریکی (موازی یا عمود بر صفحه تابش)، به صورت زیر درمی‌آید:

در حالت کلی، بزرگی میدان الکتریکی (برای هر دو مؤلفه‌های موازی و مؤلفه‌های عمود بر صفحه تابش) در بازتاب‌های متوالی به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$\begin{aligned} E_r^1 &= r_o E_i, \\ E_r^2 &= t_o \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) t_o E_i, \\ E_r^3 &= t_o \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) t_o E_i, \\ E_r^4 &= t_o \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) r_1 \exp(-i \delta_d) t_o E_i, \\ &\dots \end{aligned} \quad (2)$$

که در رابطه فوق،  $E_i$  بزرگی میدان الکتریکی موج فرودی و  $t_o, t_1, t_2, r_o, r_1, r_2$  ضرایب فرنل عبور و بازتاب مربوطه (شکل ۲) و  $\delta_d$  اختلاف فاز ناشی از عبور پرتو از عرض لایه (طی مسافت بین مرزهای لایه) هستند. در صورتی که مورد تابش عمودی ( $\theta_i = 0$ ) را در نظر بگیریم، ضرایب فرنل عبور و بازتاب برای مؤلفه‌های میدان الکتریکی موازی و عمود بر صفحه تابش برابر خواهند بود با [۲۶]:

$$\begin{aligned} (t_o)_\parallel &= (t_o)_\perp = \frac{r n_o}{n_i + n_o}, \\ (t_1)_\parallel &= (t_1)_\perp = \frac{r n_1}{n_i + n_o}, \\ (t_2)_\parallel &= (t_2)_\perp = \frac{r n_2}{n_i + n_r}, \\ (r_o)_\parallel &= -(r_o)_\perp = \frac{n_i - n_o}{n_i + n_o}, \\ (r_1)_\parallel &= -(r_1)_\perp = \frac{n_o - n_1}{n_i + n_o}, \\ (r_2)_\parallel &= -(r_2)_\perp = \frac{n_r - n_1}{n_r + n_i}, \end{aligned} \quad (3)$$

در رابطه فوق، مقدار منفی ضرایب بازتاب به معنی ایجاد یک اختلاف فاز  $180^\circ$  درجه‌ای بر مؤلفه میدان الکتریکی بازتاب شده است. همچنین اختلاف فاز  $\delta_d$  در مورد تابش عمودی را می‌توان از رابطه زیر به دست آورد [۲۶]:

$$\delta_d = \frac{r \pi}{\lambda_o} n_i d, \quad (4)$$

با فرض ناچیز بودن جذب در لایه، می‌توان روابط استوکس [۲۶] را به صورت زیر در نظر گرفت:

$$\begin{aligned} (t_o)_\parallel (t_1)_\parallel &= (r_o)_\parallel^2, \quad (t_o)_\perp (t_1)_\perp = (r_o)_\perp^2, \\ (r_o)_\parallel &= -(r_1)_\parallel, \quad (r_o)_\perp = -(r_1)_\perp, \end{aligned} \quad (5)$$

ضخامت  $525 \pm 25 \mu m$  از شرکت لتیج<sup>۳</sup> سنگاپور خریداری شد. ابتدا ویفرهای سیلیکنی به قطعاتی با ابعاد  $8mm \times 8mm$  بریده و برای شستشوی اولیه این قطعات از آب و صابون و سپس آب مقطر استفاده شد. سپس این قطعات به مدت ۱۵ دقیقه درون متانول در دستگاه فراصوت قرار گرفته و در نهایت با سشوار خشک شدند. در انتها این قطعات در داخل سلول تفلونی قرار گرفتند و به روش الکتروشیمیایی در دمای اتاق، بر روی آنها تخلخل ایجاد شد.

در مورد ویفر نوع اول، محلول الکترولیت

به  $HF (40-48 wt. \%): C_7H_5OH (4V): H_2O (DI)$  نسبت حجمی (۳۵:۵۰:۱۵) و در مورد ویفر نوع دوم، محلول الکترولیت  $HF (40-48 wt. \%): C_7H_5OH (4V)$  به نسبت حجمی (۳:۱) مورد استفاده قرار گرفت که اسید مورد استفاده و اتانول به کار رفته، هر دو محصول شرکت مرک آلمان<sup>۴</sup> بودند. در مورد ویفر نوع اول از چگالی جریان  $70 mAcm^{-2}$  به مدت ۳۰۰ ثانیه و در مورد ویفر نوع دوم اول از چگالی جریان  $130 mAcm^{-2}$  به مدت ۶۰ ثانیه استفاده شد. غلظت الکترولیت‌ها و همچنین چگالی جریان به کار رفته و مدت زمان فرایند الکتروشیمیایی به گونه‌ای انتخاب شدند که بر سطح هر دو ویفر، حفره‌هایی مشابه یکدیگر با ابعادی کمتر از ۵۰ نانومتر و ضخامت چند میکرومتر حاصل شود [۹، ۱۵ و ۳۱].

### ۲.۳. اصلاح سطح سیلیکن متخلخل

برای پایداری سطح سیلیکن متخلخل، ابتدا سطح در محلول  $H_2O_2 (3\%)$  (محصول شرکت مرک آلمان) در دمای اتاق و در محیط تاریک اکسید شد. سپس عامل‌داسازی سطح صورت پذیرفت. برای این منظور، بر سطح تمامی نمونه‌ها، ابتدا مولکول ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان<sup>۵</sup> و سپس گلو تار آلدهید<sup>۶</sup> قرار گرفت. برای این منظور ابتدا  $APTES (>98\%)$  (محصول شرکت مرک آلمان) تهیه و با استفاده از محلول آب دیونیزه /

$$R = \frac{I_r}{I_i} = \left( \frac{n_i - n_o}{n_i + n_o} \right)^2 + \left( \frac{n_r - n_i}{n_r + n_i} \right)^2 + \left( \frac{n_i - n_o}{n_i + n_o} \right) \left( \frac{n_r - n_i}{n_r + n_i} \right) \cos \left( \frac{4\pi}{\lambda_o} n_i d \right), \quad (11)$$

حال اگر به جای یک پرتو نور تکفام، طیفی از طول‌موج‌ها بر سطح لایه سیلیکن متخلخل (شکل ۲) تابانیده شود، رابطه فوق نشان می‌دهد که چگالی شار بازتابیده بر حسب عکس طول موج، یک تابع متناوب کسینوسی است که با توجه به مقادیر مثبت طول موج، تبدیل فوری این تابع، عبارت خواهد بود از [۳۰]:

$$F(w) = \left[ \left( \frac{n_i - n_o}{n_i + n_o} \right)^2 + \left( \frac{n_r - n_i}{n_r + n_i} \right)^2 \right] \delta(w) + \left( \frac{n_i - n_o}{n_i + n_o} \right) \left( \frac{n_r - n_i}{n_r + n_i} \right) \delta(w - 2n_i d), \quad (12)$$

که در رابطه فوق،  $\delta(w)$  تابع دلتای دیراک است. بنابراین، تابع  $F(w)$  در مقادیر صفر و  $2n_i d$  مقدار دارد و مقدار  $2n_i d$  ضخامت نوری موثر<sup>۱</sup> لایه نامیده می‌شود. بنابراین، در صورت تغییر ضریب شکست لایه ( $n_i$ ) یا تغییر ضریب شکست محیط پیرامون لایه ( $n_o$ )، تبدیل فوری طیف بازتاب، دچار تغییر خواهد شد. بدین ترتیب که با تغییر ضریب شکست لایه، محل قله مشاهده شده در  $2n_i d$  (و مقدار اندکی ارتفاع آن) و در صورت تغییر ضریب شکست محیط پیرامون لایه، ارتفاع قله مشاهده شده در  $2n_i d$  تغییر خواهد کرد. همان گونه که در بخش بعدی اشاره خواهد شد، این پدیده می‌تواند پایه‌ای برای تولید مبدل‌ها در یک زیست‌حسگر باشد.

## ۳. مواد و روش‌های آزمایش

### ۳.۱. ساخت سیلیکن متخلخل

برای این تحقیق از دو نوع ویفر سیلیکن نوع  $p^+$  با برش  $(100)$  استفاده شد. نوع اول دارای مقاومت ویژه  $0.5 \Omega cm$  و ضخامت  $800 \mu m$ ، ساخته شرکت سوکال نوادای<sup>۲</sup> آمریکا و نوع دوم دارای مقاومت ویژه  $0.001 \Omega cm - 0.009 \Omega cm$

۳. LATECH

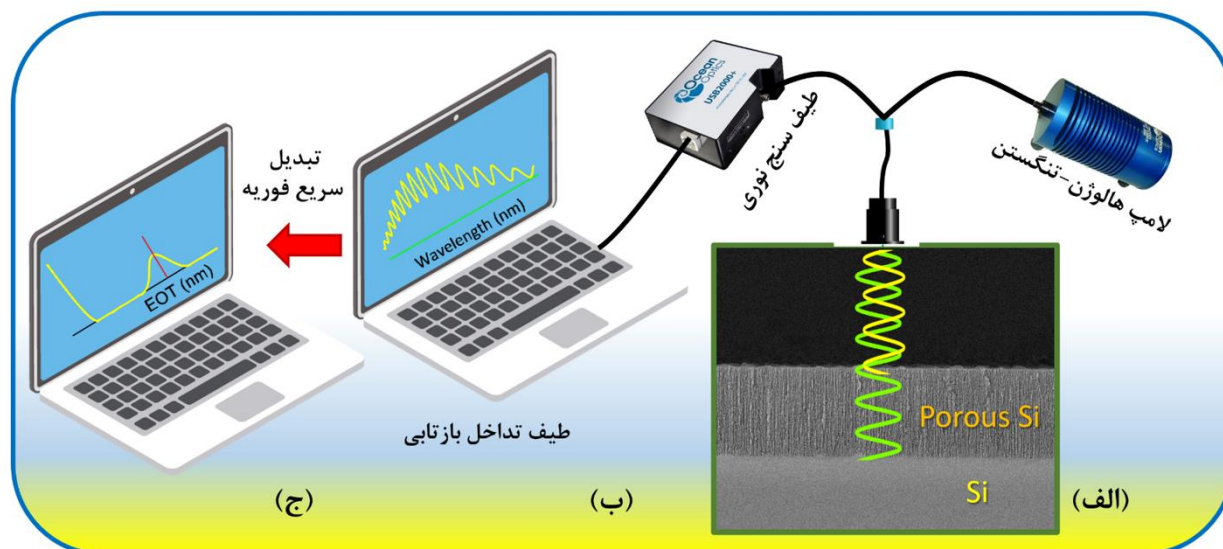
۴. Merck, Germany

۵. 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES)

۶. Glutaraldehyde (GA)

۱. Effective optical thickness (EOT)

۲. Socal Nevada



شکل ۳. (الف) چیدمان تجهیزات لازم برای طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، (ب) یک طیف بازتاب نوعی از لایه سیلیکن متخلخل و (ج) تبدیل فوریه طیف قسمت ب.

برای اتصال ژن مکمل که از شرکت ماکروجن<sup>۵</sup> کره جنوبی تهیه شده بود، سطح نمونه‌ها با محلول این ژن به غلظت  $50 \mu\text{M}$  پوشانده شد. سپس نمونه‌ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  در سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. در انتها نمونه‌ها با آب دیونیزه شسته و خشک شدند [۱۵].

برای اتصال لکتین از نوع کانکانوالین آ<sup>۶</sup> از شرکت سیگما-آلد ریچ، سطح نمونه‌ها با محلولی از این لکتین به غلظت  $2 \mu\text{M}$  در بافر PBS پوشانده شد. سپس نمونه‌ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  در سانتیگراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. در انتها نمونه‌ها با بافر شسته و خشک شدند [۳۱].

### ۳.۳. تصویربرداری از سیلیکن متخلخل

برای بررسی و مشاهده ساختار سیلیکن متخلخل از سطح و از مقطع عرضی از دو میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی مدل TESCAN MIRA3 و مدل Zeiss استفاده شد.

متانول به نسبت حجمی یک به یک، غلظت آن به مقدار ۱۰٪ رسید. نمونه‌های سیلیکن متخلخل اکسید شده در این محلول به مدت یک ساعت قرار گرفته و سپس شستشو داده شدند. در مرحله بعدی، نمونه‌ها در محلول GA (محصول شرکت مرک آلمان) قرار گرفتند که با استفاده از بافر هپس<sup>۱</sup> در  $\text{pH} = 7.4$  در آخرین  $\text{pH} = 4.7$  غلظت آن به مقدار ۲/۵ درصد رسیده بود. در آخرین مرحله، برای اتصال اختصاصی و تشخیص استئوکلسین، قطعه‌ای از ژن VKORC1 و باکتری ای-کلا<sup>۲</sup> به ترتیب، مولکول آنتی بادی استئوکلسین، ژن مکمل و لکتین به گلاتار آلدهید به صورت زیر اتصال یافت:

برای اتصال آنتی بادی استئوکلسین (خریداری شده از شرکت ابکم آلمان<sup>۳</sup>)، این آنتی بادی در غلظت  $10 \mu\text{g/ml}$  در بافر PBS<sup>۴</sup> با  $\text{pH} = 7.8$  آماده شد. سپس، این محلول بر روی سطح نمونه‌ها ریخته شده و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  در سانتیگراد قرار گرفتند. در انتها نمونه‌ها با آب دیونیزه شسته و خشک شدند.

۱. HEPES

۲. Escherichia coli (E. coli)

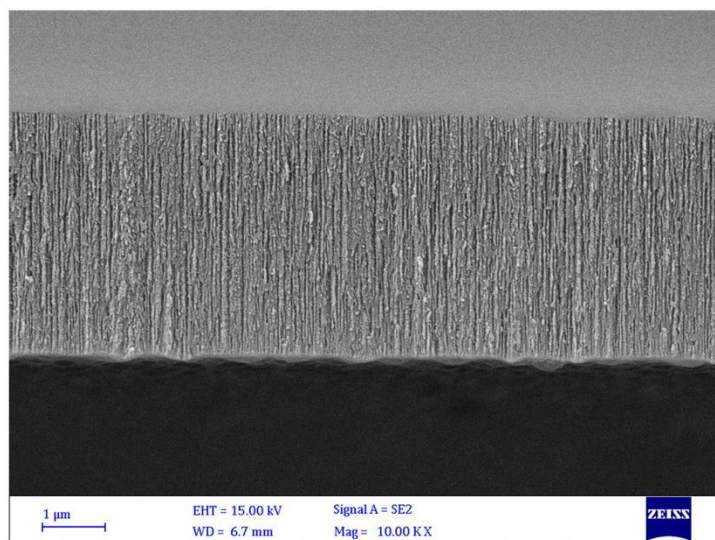
۳. abcam, Germany

۴. Bovine serum albumin

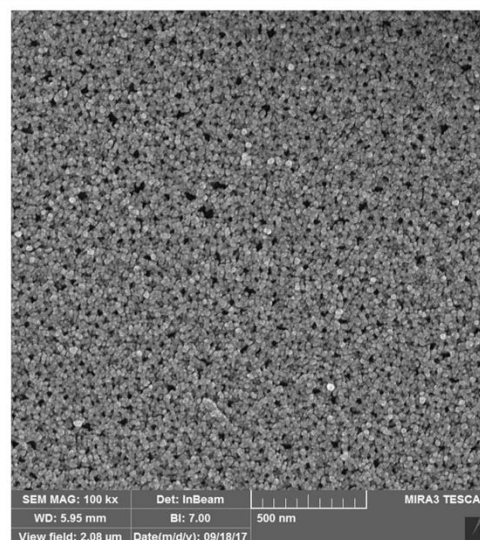
۵. Macrogen

۶. Concanavalin A





(ب)



(الف)

شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی از (الف) سطح سیلیکن متخلخل و (ب) مقطع عرضی آن.

طیف سنج است [۲۷]. بعد از به دست آمدن طیف تداخلی بازتابی، منحنی تبدیل فوریه این طیف (شکل ۳. ج) با استفاده از نرم افزار IGOR (Wavemetrics Inc., Oregon, USA)، استخراج شد (شکل ۳. ج).

برای محاسبه پاسخ زیست حسگر، ابتدا نمونه اصلاح شده سیلیکن متخلخل در معرض بافر مناسب قرار گرفت. پس از پایدار شدن شرایط، بافر حاوی آنالیت از روی نمونه، عبور داده شد و پس از رسیدن به حالت تعادل، با عبور بافر اولیه، نمونه شستشو داده شد تا مولکول‌ها و اجزای اتصال نیافته به سطح، از محیط خارج شوند. طیف تداخلی بازتابی از سطح نمونه، قبل از حضور آنالیت (در حین عبور بافر اولیه) و بعد از شستشو (با عبور بافر اولیه) گرفته و تبدیل فوریه آن استخراج شد.

با توجه به تعریف حساسیت برای یک زیست حسگر که عبارت است از شیب منحنی سیگنال گرفته شده از زیست حسگر بر حسب غلظت آنالیت [۳۲] و با توجه به تعاریف سیگنال در روابط ۱۳-۱۴، حساسیت زیست حسگر محاسبه شد.

برای افزایش قدرت تفکیک، قبل از تصویربرداری، لایه نشانی طلا بر روی نمونه‌ها انجام شد.

#### ۴.۳. طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی و اندازه گیری پاسخ زیست حسگر

برای انجام طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، پرتو خروجی از یک لامپ هالوژن-تنگستن توسط یک فیبر نوری دو شاخه‌ای، بر سطح سیلیکن متخلخل عاملدار شده به صورت عمودی تابیده شده و پرتو بازتاب یافته از سطح به طیف سنج USB4000 اوشن اپتیک ساخت آمریکا منتقل شد (شکل ۳. الف). خروجی طیف سنج که شدت پرتو بازتابیده از سطح را بر حسب طول موج (بین ۳۵۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر با دقت ۰/۱۸ نانومتر) نشان می‌دهد، با توجه به رابطه ۱۱، یک رابطه کسینوسی بر حسب عکس طول موج است (شکل ۳. ب). افت شدت این طیف در ناحیه طول موج‌های کوتاه‌تر (کمتر از ۵۰۰ نانومتر) به دلیل افت شدت لامپ هالوژن-تنگستن است و افت شدت در طول موج‌های بلندتر (بیشتر از ۸۰۰ نانومتر) به دلیل کاهش حساسیت آشکارساز سیلیکنی در

## ۴. نتایج و بحث

شکل ۴، تصاویری از سیلیکن متخلخل را نشان می‌دهد. شکل ۴-الف که مربوط به سطح لایه است، تشکیل حفره‌هایی به ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر را اثبات می‌کند. در حالی که شکل ۴-ب، نمایش مقطع عرضی لایه است و تشکیل منظم و یکنواخت حفره‌ها را نشان می‌دهد.

برای بررسی تکرارپذیری ساخت نمونه‌ها، ضخامت نوری موثر هر لایه پس از ساخت، اندازه‌گیری شد. همان گونه که قبلاً ذکر شد، این پارامتر به حاصل ضرب ضخامت لایه در ضریب شکست لایه وابسته است. بنابراین، هر گونه تغییر در ضخامت لایه، باعث تغییر در ضخامت نوری موثر آن خواهد شد. همچنین در صورتی که توزیع اندازه حفره‌ها تغییر کند، میزان تخلخل لایه متفاوت خواهد شد. در صورت اخیر نیز طبق رابطه ۱، ضریب شکست لایه و در نتیجه ضخامت نوری موثر دچار تغییر خواهد شد. بدین ترتیب، اندازه‌گیری ضخامت نوری موثر لایه‌ها که خطایی کمتر از ۱ درصد را نشان می‌داد، نشانگر تکرارپذیری قابل قبولی در ضخامت لایه‌ها و همچنین توزیع اندازه حفره‌ها در لایه بود.

برای اثبات صحیح مراحل اصلاح سطح سیلیکن متخلخل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرو قرمز استفاده شد که موفقیت‌آمیز بودن این مراحل را به اثبات رسانید [۱۵ و ۳۱].

شکل ۵، مراحل تشخیص مولکول‌های زیستی با ابعادی کمتر از ابعاد حفره‌های سیلیکن متخلخل را نشان می‌دهد. شکل ۵-الف، نمایشگر دو طیف بازتاب نوعی از سطح سیلیکن متخلخل در یک بافر مناسب است. یکی از این طیف‌ها مربوط به حالتی است که لایه با بافر اولیه به تعادل رسیده است (قبل از حضور آنالیت) و طیف دیگر بعد از تزریق آنالیت و سپس شستشو با بافر اولیه است. پس از حضور آنالیت (مانند مولکول DNA و مولکول پروتئین که معمولاً ابعادی زیر ۵۰ نانومتر دارند)، این مولکول‌ها می‌توانند به راحتی به داخل حفره‌های سیلیکن متخلخل نفوذ کنند و به سطح داخلی اصلاح شده حفره‌ها اتصال یابند (شکل داخلی در قسمت ج و د). بدین ترتیب با تغییر ضریب شکست لایه سیلیکن متخلخل ( $n_1$ )

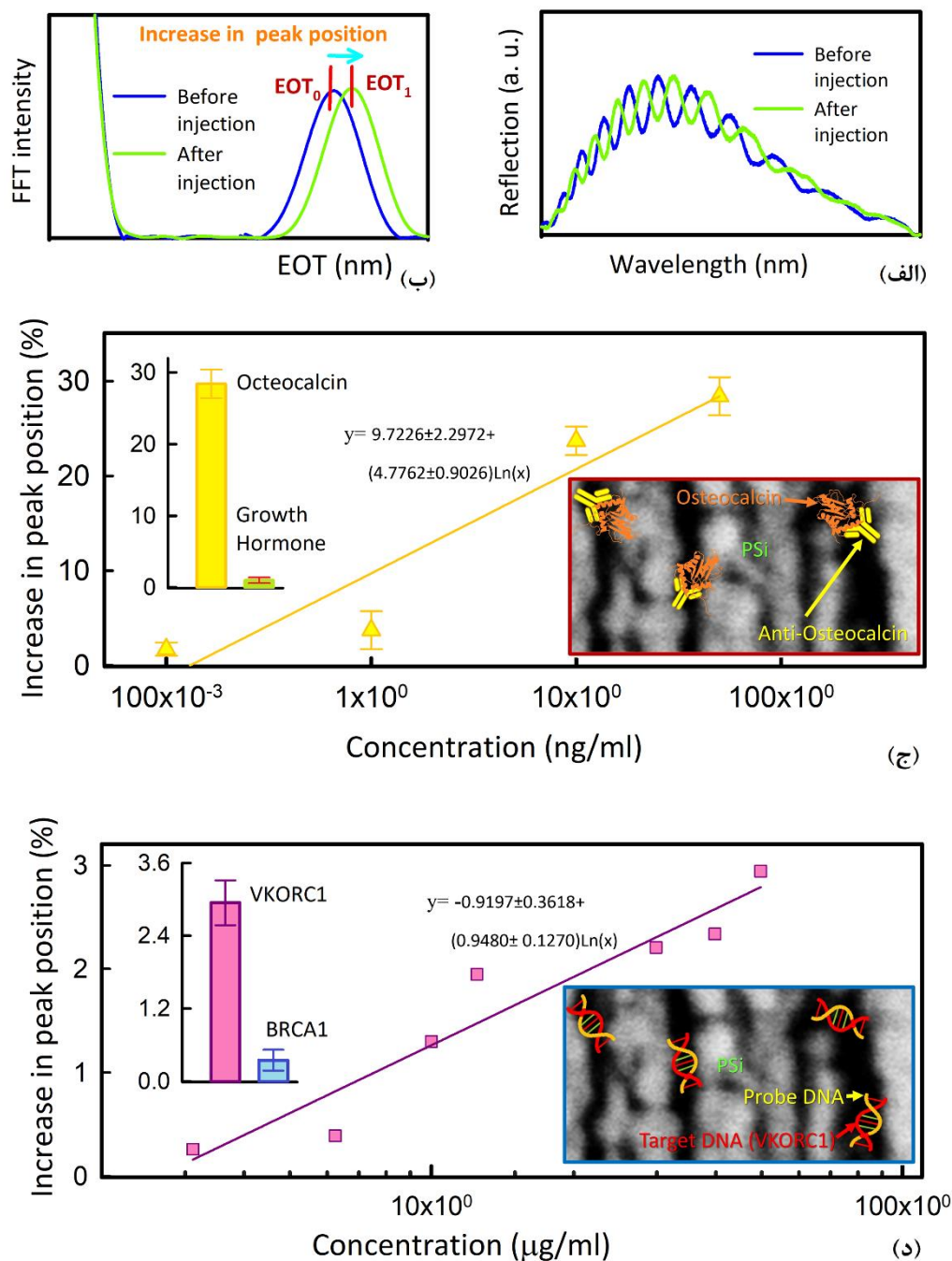
روبرو هستیم و طبق رابطه ۱۱، منحنی بازتاب بر حسب طول‌موج جابه‌جا خواهد شد. تبدیل فوریه دو منحنی نشان داده شده در شکل ۵-الف، در شکل ۵-ب، ترسیم شده است. مشاهده می‌شود که بعد از اتصال زیست‌مولکول به داخل سطح حفره‌ها و با افزایش ضریب شکست لایه، ضخامت نوری موثر لایه (EOT) افزایش می‌یابد و محل قله، طبق رابطه ۱۲، جابه‌جا می‌شود. شکل ۵-ج، درصد تغییرات ضخامت نوری موثر لایه را که طبق رابطه زیر محاسبه می‌شود، بر حسب غلظت پروتئین استوکسین نشان می‌دهد:

$$\text{Increase in peak position}(\%) = \left( \frac{EOT_1 - EOT_0}{EOT_0} \right) \times 100, \quad (13)$$

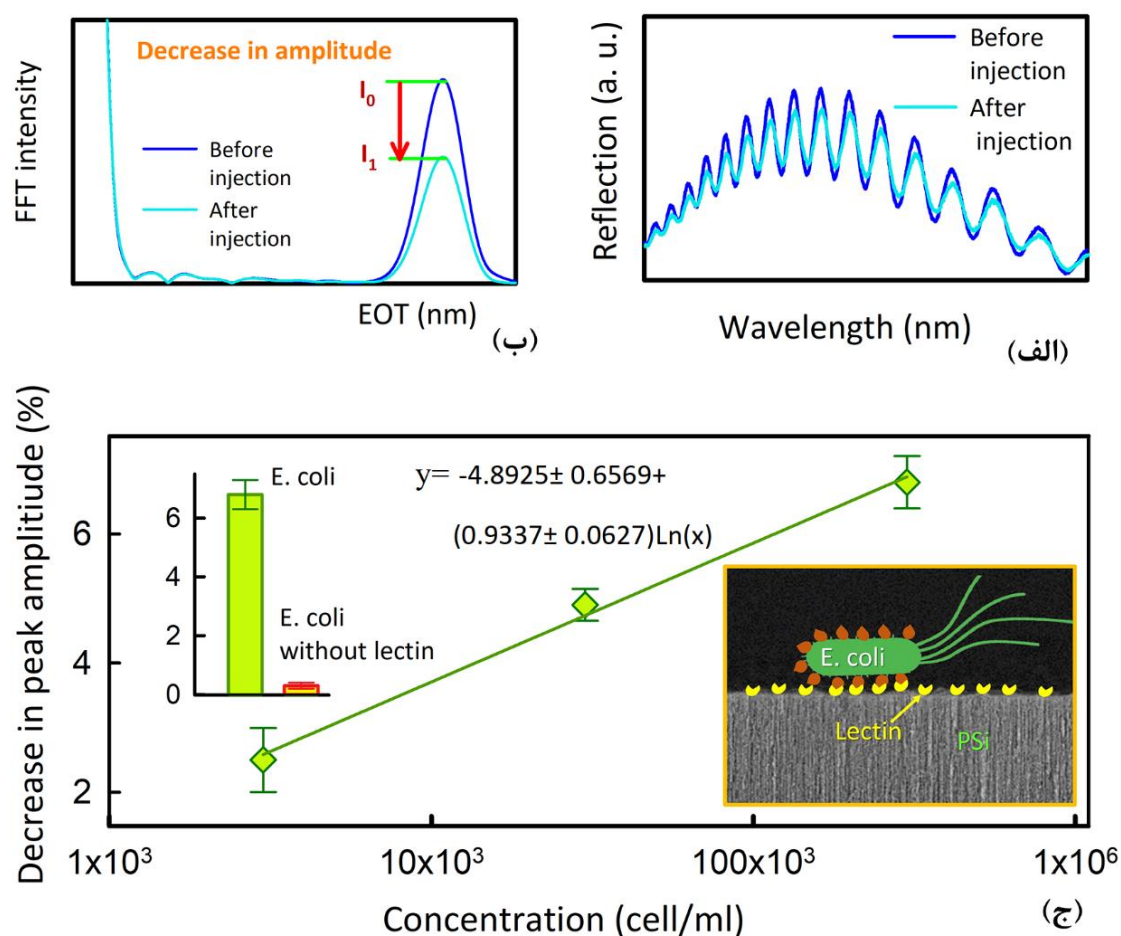
که در رابطه فوق،  $EOT_0$  و  $EOT_1$  به ترتیب عبارتند از ضخامت نوری موثر لایه قبل از حضور آنالیت (در حین عبور بافر اولیه) و ضخامت نوری موثر لایه بعد از شستشو (با عبور بافر اولیه).

استوکسین یک پروتئین وابسته به ویتامین K است که به‌عنوان یکی از رایج‌ترین پروتئین‌هایی غیرکلاژنی استخوان به شمار می‌رود. در بیماری‌های پاز، سرطان‌های متاستاز دهنده، هایپرپاراتیروئیدسم اولیه و استئودیسترفی کلیوی، غلظت این پروتئین، افزایش می‌یابد. از شکل ۵-ج مشاهده می‌شود که رابطه بین تغییرات ضخامت نوری موثر لایه با غلظت این پروتئین، بین غلظت‌های ۰/۱ تا ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، یک رابطه خطی است. با توجه به داده‌های منحنی خطی برازش شده، مقدار حساسیت زیست‌حسگر استوکسین برابر  $4/71 \pm 0/40 (ng/ml)^{-1}$  به دست می‌آید. نمودار ستونی در بخش داخلی شکل ۵-ج، درصد تغییرات ضخامت نوری موثر لایه اصلاح شده با آنتی‌بادی استوکسین را بر حسب حضور ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از دو پروتئین استوکسین و هورمون رشد در مقایسه با یکدیگر نشان می‌دهد. بنابراین دیده می‌شود که لایه اصلاح شده قدرت انتخاب نیز دارد. شکل ۵-د نیز پاسخ زیست‌حسگر را مطابق رابطه ۱۳، بر حسب غلظت قطعه‌ای از ژن *VKORC1* نمایش می‌دهد. این ژن مسئول فعال‌سازی فاکتورهای لخته‌کننده خون که وابسته به ویتامین K





شکل ۵. (الف) دو طیف بازتاب نوعی از سطح سیلیکن متخلخل قبل و بعد از حضور آنالیت ( ابعاد آنالیت کوچک‌تر از حفره‌های سیلیکن متخلخل است)، (ب) منحنی تبدیل فوریه از طیف‌های قسمت الف و (ج) درصد افزایش ضخامت نوری موثر لایه بر حسب غلظت پروتئین استئوکلسین (شکل‌های داخلی: بالا سمت چپ: مقایسه پاسخ به پروتئین استئوکلسین با پاسخ به پروتئین هورمون رشد در غلظت‌های مساوی و پایین سمت راست: طرحواره اتصال استئوکلسین به سطح اصلاح شده داخل حفره‌ها ) و (د) درصد تغییرات ضخامت نوری موثر لایه بر حسب غلظت قطعه‌ای از ژن *VKORC1* (شکل‌های داخلی: بالا سمت چپ: مقایسه پاسخ به *VKORC1* در برابر پاسخ به یک ژن غیر مکمل در غلظت‌های مساوی و پایین سمت راست: طرحواره اتصال *VKORC1* به سطح اصلاح شده داخل حفره‌ها).



شکل ۶. (الف) دو طیف بازتاب نوعی از سطح سیلیکن متخلخل قبل و بعد از حضور باکتری (ابعاد باکتری بزرگتر از حفره‌های سیلیکن متخلخل است)، (ب) منحنی تبدیل فوریه از طیف‌های قسمت الف و (ج) درصد تغییرات شدت قله مشاهده شده در منحنی تبدیل فوریه بر حسب غلظت باکتری ای-کلای (شکل‌های داخلی: بالا سمت چپ: مقایسه پاسخ سطح اصلاح شده سیلیکن متخلخل با لکتین به باکتری ای-کلای با پاسخ بدون حضور لکتین و پایین سمت راست: طرحواره حضور باکتری در سطح لایه سیلیکن متخلخل).

میکروگرم بر میلی‌لیتر از دو قطعه ژنی *BRCA1* و *VKORC1* در مقایسه با یکدیگر است. شکل ۶، مراحل تشخیص باکتری‌ها را که معمولاً ابعادی بزرگتر از ابعاد حفره‌های سیلیکن متخلخل دارند، نشان می‌دهد. به عنوان مثال باکتری ای-کلای قطری از مرتبه میکرومتر دارد. وقتی سیلیکن متخلخل در معرض این باکتری قرار می‌گیرد، باکتری توان نفوذ به داخل حفره‌های سیلیکن متخلخل را ندارد و بر سطح اصلاح شده سیلیکن متخلخل می‌چسبد (شکل داخلی در قسمت ج). شکل ۶. الف، نمایشگر دو طیف بازتاب نوعی از سطح سیلیکن متخلخل، در یک بافر مناسب است. یکی از این طیف‌ها مربوط به حالتی

هستند می‌باشد و نقش بسزایی در ایجاد مقاومت دارویی برای داروی وارفارین دارد. از شکل اخیر، خطی بودن رابطه بین تغییرات ضخامت نوری موثر لایه با غلظت قطعه‌ای از ژن *VKORC1* بین غلظت‌های ۳ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، قابل مشاهده است. با توجه به داده‌های منحنی خطی برازش شده، مقدار حساسیت زیست‌حسگر ژنی برابر  $(\mu\text{g/ml})^{-1} 0.45 \pm 0.13$  به دست می‌آید. در این آزمایش نیز، قدرت انتخاب زیست‌حسگر در نمودار ستونی بخش داخلی شکل ۵، د، دیده می‌شود. این نمودار پاسخ لایه اصلاح شده با DNA مکمل ژن *VKORC1*، بر حسب حضور ۵۰

است که لایه با بافر اولیه به تعادل رسیده (قبل از حضور باکتری) و طیف دیگر نمایش طیف بازتاب بعد از تزریق باکتری و سپس شستشو با بافر اولیه است. همان گونه که مشاهده می شود، پس از اتصال باکتری به سطح لایه، با تغییر ضریب شکست محیط پیرامون لایه ( $n$ ) روبرو هستیم و طبق رابطه ۱۱، منحنی بازتاب بر حسب طول موج جابه جا نخواهد شد؛ اما از شدت آن کاسته می شود. تبدیل فوریه دو منحنی نشان داده شده در شکل ۶. الف، در شکل ۶. ب، ترسیم شده است. مشاهده می شود که بعد از اتصال باکتری به سطح لایه و با افزایش ضریب شکست محیط پیرامون، ضخامت نوری موثر لایه (EOT) تغییری نمی کند؛ ولی از شدت قله، طبق رابطه ۱۲، کاسته می شود. شکل ۶- ج، درصد تغییرات شدت قله مشاهده شده در منحنی تبدیل فوریه (رابطه زیر) را بر حسب غلظت باکتری ای-کلای نشان می دهد:

شکل ۶- ج، نیز پاسخ این زیست حسگر به باکتری ای-کلای را در مقایسه با کنترل نشان می دهد. در اینجا کنترل، نمونه ای از سیلیکن متخلخل اصلاح شده بدون لکترین است.

## ۵. جمع بندی

طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی بر روی بستر سیلیکن متخلخل، روشی توانمند در شناسایی انواع وسیعی از زیست مولکول ها و همچنین میکروارگانیسم هایی همچون باکتری هاست. از آنجا که این روش، جزو روش های بدون برچسب محسوب می شود مزایایی از قبیل سادگی اندازه گیری، کم هزینه بودن و شناسایی زیست مولکول در حالت طبیعی خود دارد. برای استفاده از این روش، باید ابتدا سطح سیلیکن متخلخل را به منظور پایداری و همچنین توانایی در جذب مولکول شناساگر، با مولکول های شیمیایی مناسب اصلاح کرد و سپس مولکول شناساگر زیستی مناسب را به سطح چسباند تا بتواند با جذب اختصاصی هدف مورد نظر، آن را به دام ببنداند. سپس طیف بازتاب از سطح سیلیکن متخلخل گرفته شده و تبدیل فوریه آن، استخراج می شود. بر حسب اندازه آنالیت مورد استفاده (کوچک تر یا بزرگ تر از ابعاد حفره های سیلیکن متخلخل)، جابه جایی در مکان قله در منحنی تبدیل فوریه و یا تغییر در شدت قله در منحنی تبدیل فوریه معیاری برای سنجش غلظت آنالیت خواهد بود. در این تحقیق نشان داده شد که این روش می تواند برای تشخیص پروتئین استوکولسین، قطعه ای از ژن *VKORC1* و همچنین ————— بین باکتری ای-کلای به عنوان سه مثال از آنالیت های زیستی متفاوت به خوبی عمل کند.

Decrease in peak amplitude(%) =  $\left( \frac{I_1 - I_0}{I_0} \right) \times 100$ , (۱۴)

که در رابطه فوق،  $I_1$  و  $I_0$  به ترتیب عبارتند از شدت قله مشاهده شده در منحنی تبدیل فوریه قبل از حضور آنالیت (در حین عبور بافر اولیه) و ارتفاع قله مشاهده شده در منحنی تبدیل فوریه بعد از شستشو (با عبور بافر اولیه).

باکتری ای-کلای اگرچه خود بیماری زا نیست؛ اما چون به راحتی می تواند در محیط پخش شود به عنوان شاخصی برای حضور سایر میکروارگانیسم های بیماری زا می باشد. همان گونه که در شکل ۶. ج مشاهده می شود رابطه بین تغییرات شدت قله مشاهده شده در منحنی تبدیل فوریه با غلظت باکتری ای-کلای، بین غلظت های ۳۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰ سلول بر میلی لیتر، یک رابطه خطی است. با توجه به داده های منحنی خطی برازش شده، مقدار حساسیت زیست حسگر باکتری ای-کلای برابر

## مراجع

1. A. Rasooly et al., "Biosensors and biodetection", Springer, (2009).
2. A. N. Kozitsina, et al., *Biosensors*, **8**, 2 (2018) 1.
3. N. Khansili, G. Rattu, and P. M. Krishna, *Sensor Actuat B-chem*, **265** (2018) 35.
4. X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, *Anal. Chim. Acta*, **620**, 1-2 (2008) 8.
5. V. S. Y. Lin, K. Motesharei, K. P. S. Dancil, M. J. Sailor, and M. R. Ghadiri, *Science*, **278**, 5339 (1997) 840.
6. D. Holthausen, R. B. Vasani, S. J. P. McInnes, A. V.

- 1776.
21. Z. Li, Y. Tang, et al., *Lab. Chip.* **14**, 2 (2014) 333.
22. Y. Tang, L. Zhen, et al., *Anal. Chem.* **85**, 5 (2013) 2787.
23. J. Wu and M. J. Sailor, *Adv. Funct. Mater.* **19**, 5 (2009) 733.
24. H. Lin, et al., *Langmuir* **20**, 12 (2004) 5104.
25. M. Sedighi, et al., *J. Mater. Sci.* **53**, 21 (2018) 14975.
26. E. Hecht, "Optics fifth edition. chap. 9" Pearson (2017).
27. M. J. Sailor, "Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications. chap. 5", Wiley (2012).
28. H. Angus Macleod, "Thin film optical Filters 4th Ed". CRC Press (2010).
29. O. S. Heavens, "Optical properties of thin solid films", Courier Corporation (1991).
30. J. W. G. Gray and M. Robert, "Fourier transforms: an introduction for engineers". Springer Science & Business Media, (2012).
31. M. Yaghoubi, F. Rahimi, B. negahdari, A. H. Rezayan and A. Shafiekhani, *Sci. reports* **10** (2020) 16017.
32. D. G. Buerk, *Biosensors: "Theory and applications"*, CRC Press, (2014).
- Ellis, and N. H. Voelcker, *ACS Macro Lett.* **1**, 7 (2012) 919.
7. J. Feng, W. Zhao, B. Su, and J. Wu, *Biosens. Bioelectron.* **30**, 1 (2011) 21.
8. R. Vilensky, M. Bercovici, and E. Segal, *Adv. Funct. Mater.* **25**, 43 (2015) 6725.
9. F. Rahimi et al., *Cell J.* **20**, 4 (2019) 584.
10. N. Yu and J. Wu, *Biosens. Bioelectron* **146** (2019) 111726.
11. M. Terracciano et al., *Molecules* **24**, 12 (2019) 1.
12. N. Massad-Ivanir, C. Shtenberg, T. Zeidman, and E. Segal, *Adv. Funct. Mater.* **20**, 14 (2010) 2269.
13. N. Massad-Ivanir et al., *Sci. Rep.* **6** (2016) 1.
14. K. Urmann, S. Arshavsky-Graham, J. G. Walter, T. Scheper, and E. Segal, *Analyst*, **141**, 18 (2016) 5432.
15. F. Makiyan, F. Rahimi, M. Hajati, A. Shafiekhani, A. H. Rezayan, and N. Ansari-Pour, *Colloids Surfaces B* **181** (2019) 714.
16. T. Guinan et al., *Langmuir* **29**, 32 (2013) 10279.
17. Z. Li, et al., *Biomechanics* **10**, 6 (2016) 1.
18. M. P. Schwartz et al., *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* **204**, 5 (2007) 1444.
19. M. P. Schwartz, et al., *Anal. Chem.* **79**, 1 (2007) 327.
20. N. H. Voelcker, et al., *ChemBioChem* **9**, 11 (2008)