

УДК 621.3.082.8

Сьогодення та майбутнє розвитку технологій секвенування ДНК

Васильєв Д.Ю., к.т.н., доц. Терлецький О.В.

В статті представлені переваги та недоліки сучасних методів секвенування ДНК. Розглядаються ключові особливості різних технологій, а також більш детально представлений метод, який заснований на використанні графенового транзистора (GFET).

Побудовані передаточні характеристики GFET з використанням аналітичної моделі. Метою їх побудови було дослідити спроможність використання графенового транзистора в якості основи для виробництва секвенатору, який буде спроможний швидко, а головне точно проводити секвенування ДНК не тільки у великих комерційних установах, а і в невеличких державних лікарнях.

Отримані характеристики дають змогу з впевненістю сказати, що GFET – придатний для використання в приладах для секвенування ДНК наступного покоління.

Сучасні методи дослідження ДНК

Зростаюча потреба в дешевому і швидкому секвенуванні (набір біохімічних методів встановлення

послідовності нуклеотидних основ ДНК: аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну) генома (сукупність всієї спадкової генетичної інформації організму, тобто всіх генів) людини, сприяло розвитку нових технологій секвенування, однак, вартість все ще далека від ідеальної з ціною в \$1.000 за дослідження одного генома. Це означає, що повинні бути розроблені більш дешевші і швидші методи секвенування ДНК. Для цих потреб, було розроблено нове покоління технологій секвенування ДНК з використанням нанотехнологій, які вважаються більш дешевшими і швидшими, через відсутність маркерів(біологічне з'єднання або властивість, яке свідчить про наявність якого-небудь специфічного розладу або схильності до нього) [1,2]. Зокрема, метод секвенування з використанням тільки однієї молекули вважається перспективною технологією. «Одинична молекула» для секвенування з нанопор була рекомендована в якості платформи наступного покоління технологій секвенування ДНК [3].

В останнє десятиліття технології секвенування розвивалися дуже швидкими темпами з одночасним зниженням витрат на кожен основу

ДНК. Секвенування, яке десять років тому коштувало 3 млрд. доларів для проекту "Геном людини", сьогодні можна здійснити за десятки тисяч доларів. Після успішного секвенування генома людини були розроблені технології повногеномного секвенування, які мають свої слабкі і сильні сторони. Основними комерційними технологіями є платформи: 454 Sequencing (Roche), Solexa / Illumina (Illumina), SOLiD (Applied Biosystems) і Polonator (Dover)[4]. Інтенсивна конкуренція, між так званими "технологіями нового, або другого, покоління", привела до зниження вартості секвенування геному.

В даний час з'явилися і активно розвиваються платформи ДНК-секвенування "третього покоління", представлені приладами: Helicos Heliscope (Helicos BioScience Corporation), PacBio RS SMRT (Pacific Biosciences) і MinION (Oxford Nanopore) [4]. Третє покоління відрізняється від другого тим, що первинна ампліфікація (процес утворення додаткових копій ділянок ДНК) ДНК більше не потрібна. Досліджувана ДНК секвенується безпосередньо на рівні однієї молекули з використанням спеціально створених полімераз (ферменти, головною роллю яких є синтез нуклеїнових кислот). Перевагою цього підходу є те, що вдається уникнути проблем, пов'язаних з накопиченням помилок, що виникають при ампліфікації ДНК. Однак, важливо зазначити, що жодна з технологій

третього покоління поки не отримала широкого розповсюдження.

Через це почалися розробка нанопорного секвенування, як показано на рис. 1, негативно заряджена молекула ДНК приводиться в рух за допомогою прикладеного електричного поля, щоб пройти через нанопори. Процес проходження молекули ДНК, яка проходить через нанопору, визначається як транслокація, а відповідний інтервал часу визначається, як час транслокації. В процесі транслокації ДНК, блокада струму значно менша, ніж струм нанопори, так як діелектрична проникність молекули ДНК значно менша, ніж у води. Цей струм визначається як струм блокади. Визначення різниці в блокаді струмів дозволяє розрізнити ДНК на одному рівні з базовою нанопорою. Таким чином, дослідження блокади струмів є досить популярне в останні роки.[5].

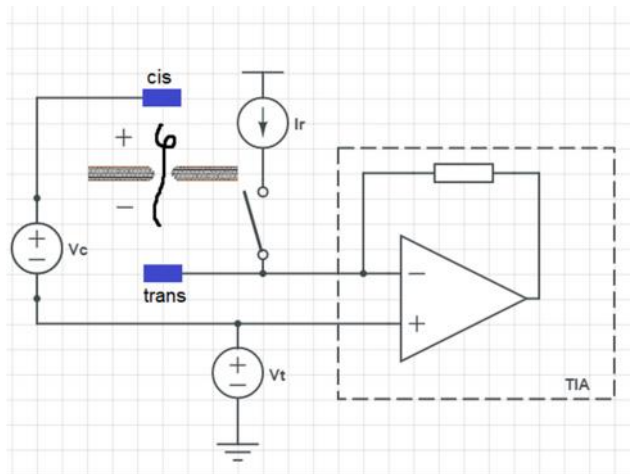


Рис. 1 Базова електрична схема для секвенування, включає трансімпедансний підсилювач (TIA), регульовану напругу V_c і V_t , також джерело струму I_r ,

яке використовується для калібрування

Сенсор на основі графенового польового транзистора (GFET)

Принцип дії GFET базується на ефекті електричного поля - змінюючи концентрацію носіїв заряду в графені за допомогою затворної напруги, можна керувати провідністю графена, яка приблизно пропорційна їх концентрації.

GFET датчики, складаються з двох термінальних графенових пристроїв, які використовуються для моніторингу молекуло-індукованої властивості графена. Вони побудовані з одношарового графена (SLG), ширина каналу якого 5-50 мкм, а довжина 25-200 мкм, на вершині знаходиться SiO₂ затвор транзистора, легований Si.

Принцип дії сенсора для секвенування ДНК на основі GFET, заснований на методі адсорбції (вибіркове поглинання речовини з газового чи рідкого середовища усім об'ємом твердого тіла чи рідини) азотистих основ ДНК каналом графену. Провідність графену змінюється після адсорбції гуаніну або іншої азотистої основи ДНК і завдяки цьому визначають послідовність азотистих основ ДНК, оскільки кожна азотиста основа, після проходження струму через неї, має свої відмінні одна від одної значення провідності, що дає можливість досить точно їх відрізнити одна від одної.

Для того, щоб досягти високих показників роботи транзистора,

використовують одне з унікальних властивостей графена, а саме - при прикладенні до поверхні графенової плівки електричного потенціалу певної величини відбуваються сильні зміни величини енергетичного бар'єру тунелювання електронів.

Електричні транспортні виміри отримують шляхом установки постійної напруги між контактами стоку і витoku (V_{SD}) і моніторингу різниці струмів стоку та витoku (I_{SD}), в той час, як змінюється напруга на затворі (V_G) рис.2. [7]

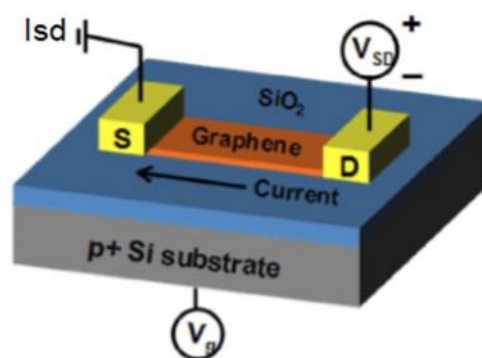


Рис2 Схематичне зображення GFET для секвенування ДНК

Підвищення чутливості GFET до одиночних азотистих основ є подальше зменшення площі каналу аж до режиму графенових нанострічок. Зменшення площі каналу збільшує рівень шуму пристроїв, які працюють на низьких частотах і це приводить до того, що виявити азотисті основи стає набагато складніше [8,9]. Крім того, електронний транспорт в графенових нанострічках показав, що він залежить від квантових ефектів (це принцип невизначеності, який стверджує, що існують фундаментальні перешкоди для точного одночасного вимірювання

двох або більшої кількості параметрів системи з довільною похибкою) [10].

Останні досягнення у виробництві графенових пристроїв дозволяють їм мати рухливість носіїв заряду приблизно $2 \cdot 10^5 \text{ см}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [9], а також зменшення шумів в графенових пристроях [11] обіцяє забезпечити поліпшення чутливості приладу в три рази. Цього було б досить, щоб виявити одну азотисту основу гуаніну, цитозину, тиміну на графеновому пристрої площею $100 \cdot 100 \text{ нм}^2$. Однак, щоб була змога виявити аденін, потрібно додатково підвищити чутливість пристрою. Це наводить на думку, що практичне секвенування ДНК з GFET пристроїв потребує використання графенових нанострічкових пристроїв, які можуть демонструвати зовсім іншу реакцію на адсорбції (вибіркове поглинання речовини з газового чи рідкого середовища поверхневим шаром твердого тіла – адсорбенту, чи рідини) азотистих основ ДНК, ніж звичайний графеновий транзистор через існування крайових ефектів [10,11].

Жодна гібридизація (явище взаємодії атомних орбіталей на визначеному атомі із утворенням такого ж числа нових гібридних орбіталей, котрі є рівними за своїми характеристиками (енергією і формою)) π -орбіталей графена не спостерігалось після осадження азотистих основ на піддослідні зразки. Це говорить про те, що взаємодія азотисті основи-графен стримується тільки завдяки силам Ван-дер-Ваальса. Ця точна адсорбція важлива для датчиків, які покладаються на

механізм чуттєвого захоплення і звільнення азотистих основ.

Прийнято вважати, що адсорбція молекул на поверхні графену призводить до утворення молекулярних диполів (сукупність двох рівних за абсолютною величиною різнойменних точкових зарядів, що знаходяться на деякій відстані один від одного) в шарі адсорбата. Вплив електричного поля, створюваного таким дипольним шаром, при якому є модуляція поверхневого потенціалу металу, може бути вимірний як зміна функції робочої поверхні графену [12,13].

Після того, як було описано, принцип секвенування за допомогою GFET, побудуємо характеристики самого транзистора.

Одна із самих головних характеристик, які дозволяють визначити придатність GFET для секвенування ДНК, це відношення струму стоку до напруги затвору.

$$I_{ds} = \frac{W \int_0^{V_{ds}} \mu Q_{tot} dV}{L + \left| \int_0^{V_{ds}} \frac{\mu}{V_{sat}} dV \right|}, \quad (1)$$

де W – ширина каналу, L – довжина каналу, μ – ефективна рухливість електронів і дірок, Q_{tot} – щільність заряду листа графена, V_{sat} – швидкість насичення.

Припускається, що швидкість насичення є причиною розсіювання фононів в графені, в момент досягнення носієм заряду певного

енергетичного порогу [14] і потенціалу, що призводить до появи розраховується за формулою 2 . ям.

$$V_{sat} = \frac{2\mathcal{G}_F}{\pi} = \frac{\hbar\Omega}{\hbar\sqrt{\frac{\pi Q_{net}}{q}}} \quad (2)$$

$$Q_t = q(c_6 + c_4 V_{ch}^2) \quad (6)$$

\mathcal{G}_F – швидкість Фермі, для графену приблизно 10^6 м/с, $\hbar\Omega$ – оптична фононна енергія, q – елементарний заряд, Q_{net} – мобільна потужність заряду листа.

Q_{net} може використовуватись, як щільність густини заряду і виражається як

$$Q_{net} = |q(p - n)| \quad (3)$$

де q – елементарний заряд, p – щільність дірок, n – щільність електронів.

Рівняння (3) придатне і для звичайних польових транзисторів (FET).

$$Q_{tot} = Q_t + q \times n_{pud} \quad (4)$$

де Q_t – щільність заряду, для транспортних характеристик, n_{pud} – щільність заряду для електронно-діркових ям.

Щільність залишкового заряду, відомого як електронно-діркові ями і розраховується завдяки рівнянню(5).

$$n_{pud} = \frac{\Delta^2}{\pi(\hbar\mathcal{G}_F)^2} \quad (5)$$

де \mathcal{G}_F – швидкість Фермі, Δ – просторова неоднорідність

де V_{ch} – напруга каналу,
 $c_6 = \frac{\pi(kT)^2}{3(\hbar\mathcal{G}_F)^2}$ і $c_4 = \frac{q^2}{\pi(\hbar\mathcal{G}_F)^2}$.

В результаті після підстановки маємо.

$$Q_{tot} = q(c_6 + c_4 V_{ch}^2 + n_{pud}), \quad (7)$$

Потенціал каналу V_{ch} розраховується за формулою:

$$V_{ch} = -\frac{(V_{gs} - V_{gs0} - V)C_1 + (V_{bs} - V_{bs0} - V)C_b}{C_t + C_b + \alpha C_q} \quad (8)$$

де α – ваговий коефіцієнт ємності і дорівнює $\frac{Q_{net}}{C_q V_{ch}}$, C_q – квантова ємність, V падіння напруги в графеновому каналі, V_{bs} і V_{gs} напруга затворів, C_t і C_q оксид ємності верхнього і нижнього затвору[13]

$$C_q = \frac{2q^2 kT \ln(4)}{\pi(\hbar\mathcal{G}_F)^2} \times \sqrt{1 + \left(\frac{qV_{ch}}{kT \ln(4)}\right)^2} \quad (9)$$

Таблиця 1. Основні параметри для побудови характеристик

$\min V_g$	-10В
$\max V_g$	10В

V_{DS}	1В
T	300К
L	30нм
W	5нм
Δ	0.092
t_{oxe}	25нм
E_{max}	1eВ

В результаті є можливість побудувати передаточну характеристику (рис.1.), залежність сумарної щільності заряду Q_{tot} (рис.2.) та потенціалу V_{ch} (рис.3.) від напруги на затворі [13].

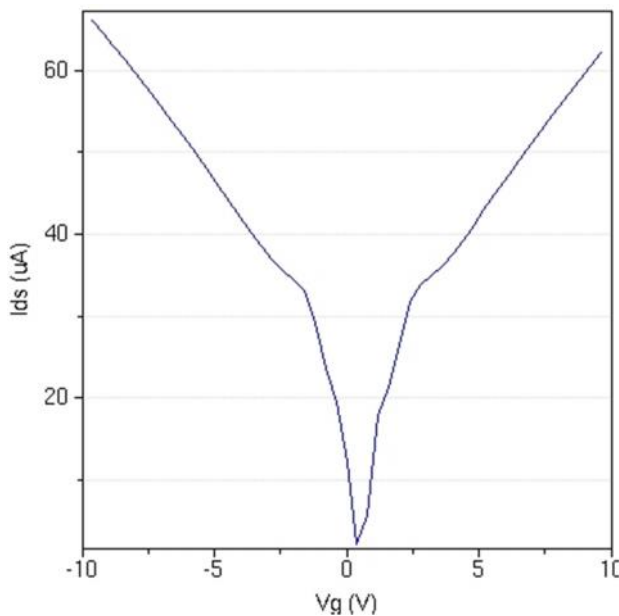


Рис. 1. Результати моделювання струму стоку при напрузі на затворі, яка змінюється від -10 V до 10 V.

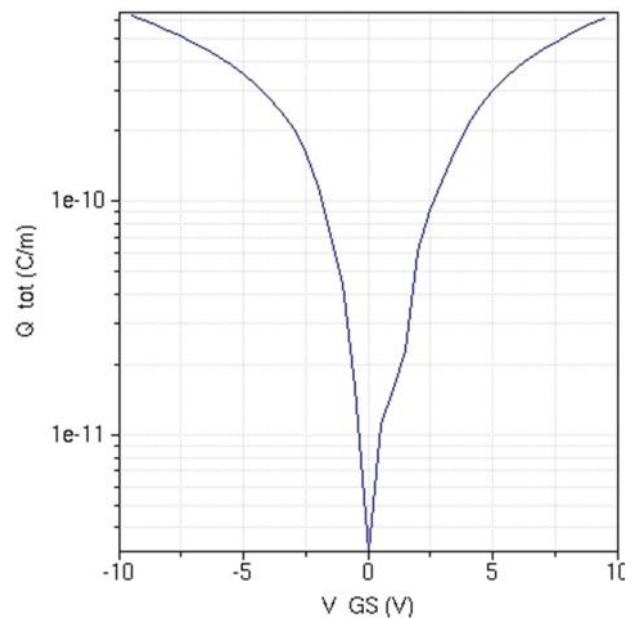


Рис.2. Залежність щільності заряду від напруги на затворі в межах -10 V - 10 V .

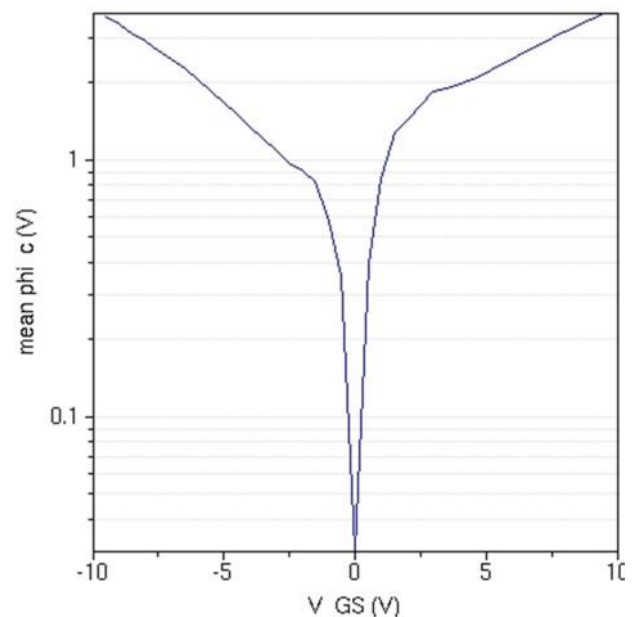


Рис.3 – Залежність потенціалу V_{ch} від напруги на затворі в межах $V_{GS}^{max} = -10$ V - 10 V .

Після порівняння отриманих результатів з дослідженнями [15], можна сказати, що підібрані параметри напруги на затворі $V_g = -10$ – 10В, напруги стоку $V_D = 1$ В,

температури $T = 300\text{K}$, довжини каналу $L = 30\text{ нм}$, ширини каналу $W = 5\text{ нм}$ та інших, які використовувались для моделювання графенового транзистора підходять для розробки секванатору на основі GFET. Завдяки цьому в майбутньому буде змога проводити секвенування ДНК і мати точні результати виміру. Оскільки в залежності, яка представлена на рис.1 струм стоку змінюється в межах $0 - 60\text{ нА}$ при напрузі $-10 - 10\text{ В}$. Щоби побачити відмінність між азотистими основами, потрібно, щоб струм стоку був в цих межах через те, що при абсорбції азотистих основ з графенового каналу струм змінюється в межах від 10 до 400 нА в залежності від азотистої основи.

Датчики GFET, мають кілька переваг перед об'ємними напівпровідниковими пристроями, включаючи кремній. Атомарно тонкий кремній або інші об'ємні напівпровідники неефективні, оскільки, при товщині каналу в один атом, поверхневі дефекти домінують в характеристиках матеріалу. Двовимірні матеріали, такі як графен, не мають поверхнево обірваних зв'язків для утворення дефектів. В результаті графен має високу провідність і є чутливим до поверхневих ефектів. Крім того, оскільки матеріал не має обірваних зв'язків, він усуває неспецифічне зв'язування (зв'язок антитіл відбувається без специфічної прив'язки до мембран клітини) і, отже, помилкові спрацьовування, що було проблемою для інших датчиків на основі польових транзисторів. При

правильній функціоналізації GFET завдяки своїм властивостям забезпечить високочутливе, високоселективне секвенування цілої молекули ДНК [16].

Висновки

1. Проведене моделювання дало змогу з'ясувати, які значення напруги на затворі, напруги стоку температури, довжини каналу, ширини каналу графенового польового транзистору, придатні для секвенування ДНК і на його основі є можливість в не далекому майбутньому побудувати пристрій з розміром в звичайний USB –флеш-накопичувач.
2. Виняткові електронні властивості графена продовжують зберігати високі перспективи у використанні в якості основи для секванаторів ДНК. Датчики на основі GFET для біологічних і хімічних застосувань дозволять швидко, точно і недорого повністю провести електронне зчитування цілої однієї молекули ДНК. Крім того, датчики GFET можуть бути мультиплексовані, що дозволяє швидко тестувати кілька цілей (від десятків до тисяч) з високою чутливістю на одному маленькому чіпі.
3. Біосенсори на основі GFET стали однією з найперспективніших технологій для секвенування ДНК. Проте, ці пристрої все ще потребують

вдосконалення для підвищення продуктивності реального виявлення послідовності структури ДНК. Поетапне вдосконалення виробництва та безперервна оптимізація параметрів призвели до усунення неспецифічної молекулярної взаємодії, що сприяло поліпшенню чутливості та надійності біосенсорів. Впровадження нових процесів проектування та матеріалів представило нові робочі прототипи, які можуть призвести до найшвидшого впровадження даних приладів в життя.

Література

1. Harding JD. Single-molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing // Trends in Biotechnology, 1992. – №10. – P.55-57.
2. Pushkarev D, Neff NF, Quake SR. Single-molecule sequencing of an individual human genome // Nature Biotechnology, 2009. – №27. – P.847-850.
3. Ku CS, Roukos DH. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine // Expert Rev Med Devices, 2013. – №10 – P.1-6.
4. Сукчев М. Современные методы полногеномного секвенирования (расшифровки) ДНК в диагностике и лечении заболеваний / [Электронный ресурс] 21.03.2013 доступ: <http://www.innoros.ru/publication/s/articles/13/sovremennyye-metody-polnogenomnogo-sekvenirovaniya-rasshifrovki-dnk-v-diagno>.
5. Lijun Liang. Introduction // Computational studies of DNA sequencing with graphene nanopores, 2014. – P.1-10.
6. Xu G. et al. Low-noise submicron channel graphene nanoribbons / [Электронный ресурс] 2010 доступ: http://xuguangyu.bol.ucla.edu/ApplyPhysLett_97_073107.pdf.
7. Tianhua Yu, Chen-Wei Liang, Changdong Kim, and Bin Yu. Local electrical stress-induced doping and formation of monolayer graphene P-N junction / [Электронный ресурс] July 2011 доступ: https://www.researchgate.net/publication/224242225_Local_Electrical_Stress-Induced_Doping_and_Formation_of_2D_Monolayer_Graphene_P-N_Junction.
8. Xu G. et al. Enhanced conductance fluctuation by quantum confinement effect in graphene nanoribbons // Nano Letters, 2010. – № 10 – P.4590–4594.
9. Yang Y., Murali R. Impact of size effect on graphene nanoribbon transport // IEEE Transactions on

- Electron Devices, 2010 – № 31 – P.237–239.
10. Basu, D., Gilbert, M. J., Register, L. F., Banerjee, S. K. & MacDonald, A. H. Effect of edge roughness on electronic transport in graphene nanoribbon channel metal-oxide-semiconductor field-effect transistors / [Електронний ресурс] 2008 доступ: <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0712/0712.3068.pdf>.
11. Monti O. L. A. Understanding interfacial electronic structure and charge transfer: an electrostatic perspective // J. Phys. Chem, 2012. – № 3 – P.2342–2351.
12. Piana, S., Bilic, A. The nature of the adsorption of nucleobases on the gold [111] surface // J. Phys. Chem, 2006 – P.23467–23471.
13. Paolo Michetti, Giuseppe Iannaccone. Model for Far From Equilibrium Transport in CNT/GNR FETs / [Електронний ресурс] 2015 доступ: <https://nanohub.org/tools/ffetool>.
14. Sofia Sjölander. MODELLING GRAPHENE FIELD-EFFECT TRANSISTORS / [Електронний ресурс] December 19, 2017 доступ: <http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordId=8929559&fileId=8929560>.
15. Nikolai Dontschuk, Alastair Stacey, Anton Tadich, Kevin J. Rietwyk, Alex Schenk, Mark T. Edmonds, Olga Shimoni, Chris I. Pakes, Steven Prawer & Jiri Cervenka .A graphene field-effect transistor as a molecule-specific probe of DNA nucleobases / [Електронний ресурс] 24 March 2015 доступ: <https://www.nature.com/articles/ncomms7563>.
16. Victoria Tsai and Bruce Willner. Graphene Field Effect Transistors for Biological and Chemical Sensors / [Електронний ресурс] доступ: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/graphene-field-effect-transistors.html>