

Elektrisk detektion av peptidmodifikationer



Kim Björkström, 36044

Pro gradu-avhandling i fysik

Handledare: Ronald Österbacka

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

September 2020

Innehåll

1	Introduktion	1
1.1	Biosensorns egenskaper och tillämpningar	2
1.1.1	Detektionsförmåga och pålitlighet	3
1.2	Proteiner	4
1.2.1	Proteiner som receptor och analyt	5
1.2.2	Posttranslationell modifiering	6
1.3	Självorganiserade monolager	7
2	Teori	9
2.1	Den organiska fälteffekttransistorn	9
2.1.1	Grundläggande funktionalitet	10
2.1.2	Utmatningsegenskaper	11
2.1.3	Överföringsegenskaper	14
2.2	Jonmodulerad organisk FET	16
2.2.1	Det elektriska dubbelskiktet	18
2.2.2	Detektion genom kapacitansförändring	21
2.3	Detektionsgräns	23
3	Experimentellt	26
3.1	Provtillverkning	26
3.1.1	Resistor	26
3.1.2	Funktionaliserad gateelektrod	27
3.2	Mätuppställning	30
3.3	Mätprocedur	31
4	Resultat och diskussion	34
4.1	Behandling av resultat	34

4.1.1	Normalisering	34
4.1.2	Positiv kontroll med icke-fosforylerad peptid	35
4.1.3	Negativ kontroll med fosforylerad peptid	36
4.1.4	Negativ kontroll med biotinmättad yta	37
4.2	Analys av resultat	38
4.2.1	Problem och möjliga förbättringar	40
5	Sammanfattning och slutsatser	43
	Litteratur	45

Abstrakt

Markörfri detektion av enskilda molekyler öppnar upp nya forskningsmöjligheter. Diagnos av autoimmuna sjukdomar och drogtestning är exempel på områden som använder sig av molekyldetektering. Att snabbt och billigt kunna detektera små mängder av en specifik molekyl till exempel i ett blodprov skulle underlätta i dessa områden. I denna avhandling utforskas möjligheten att elektriskt detektera enskilda molekyler med en organisk transistor. Molekylerna i detta projekt är peptider som har blivit designade specifikt för att testa den organiska transistorn som detektionsanordning.

En jonmodulerad organisk fälteffekttransistor är känslig för förändringar på elektrodytorna, vilket gör den en ypperlig anordning för detektering av enskilda molekyler. Genom att bygga upp ett lager av olika biologiska material på en av elektrodytorna kan peptiderna fästas på den. När en komplementär peptid binder sig fast i ytan kommer kapacitansen att förändras som i sin tur förändrar strömmen som flyter genom transistorn. Modifikationer hos peptiderna på ytan förhindrar att denna komplementära peptid binds fast. Detektionen är alltså beroende på avsaknaden av dessa specifika peptidmodifikationer. Resultaten från dessa experiment visar att detektering av väldigt få molekyler med denna metod är möjlig. Det finns dock många olika steg och beståndsdelar som ska fungera för att få en bra detektion, vilket har gjort resultaten svåra att reproducera.

Implementeringen av denna elektriska biosensor har öppnat upp möjligheten för vidare forskning. Denna transistoranordning är fortfarande under utveckling och är en viktig del i ett flertal olika tvärvetenskapliga forskningsprojekt som innefattar igenkänning av biokemiska reaktioner och molekyldetektering.

Kapitel 1

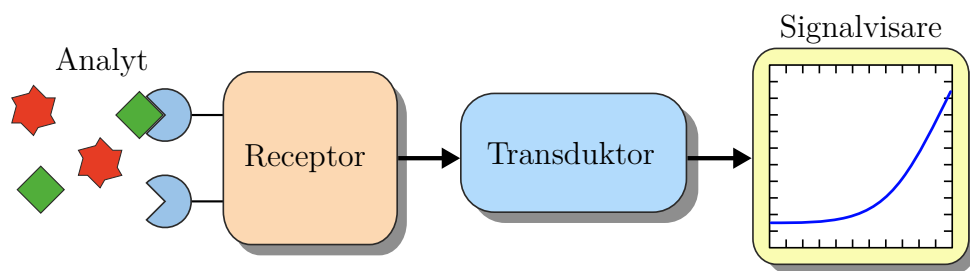
Introduktion

Sensorer är anordningar som har förmågan att detektera en fysikalisk händelse och förmedla vidare information om händelsen. Termometer, barometer, brandalarm och autopilot är några exempel på instrument och system som använder sensorer. En analog termometer med kvicksilver utnyttjar värmeutvidgning för att reagera på förändring i temperatur och förmedlar informationen med hjälp av en sifferskala. Digitala infraröda termometrar kan istället använda värmestrålningen från ett objekt och omvandla det till en elektrisk signal som representerar temperaturen. Ett flygplans autopilotsystem använder många olika sensorer som detekterar förändringar i till exempel tryck och hastighet för att reglera höjd och acceleration. En sensor består huvudsakligen av två olika delar: ett detektorelement som reagerar på en händelse samt en transduktor som omvandlar reaktionen till en mätbar signal.

Syftet med denna avhandling är att utveckla en biosensor för detektion av posttranslationella peptidmodifikationer med hjälp av en organisk jonmodulerad fälteffekttransistor. Biosensorns olika delar byggs experimentellt upp och detektionselementet är ett biolager bestående av ett flertal biologiska komponenter och transistorn är transduktorn som omvandlar förändringarna i biolagret till mätbara strömsignaler. Mer specifikt undersöks transistorns drainström som funktion av gatespänning när biolagret utsätts för en analys. Experimenten har utförts som del av OBESIMO-projektet (*Organic Bio-Electronics: Protein Post-translational Modification Sensing using Ion-Modulated OFETs*) tillsammans med Åbo Universitet och *University of Bari Aldo Moro* i Italien.

1.1 Biosensors egenskaper och tillämpningar

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definierar en biosensor som en anordning där specifika biokemiska reaktioner, förmedlade av isolerade enzymer, immunsystem, vävnader, organeller eller hela celler, används för att detektera kemiska föreningar med hjälp av elektriska, termiska eller optiska signaler [1]. Detektorelementet i en biosensor är oftast någon slags biologisk receptor och kan detektera en kemisk substans som är av analytiskt intresse, en så kallad analyt. Detektionshändelsen har oftast en fysikalisk-kemisk konsekvens, till exempel förändring i massa, laddning, temperatur eller pH. Biosensors transduktor är en fysikalisk anordning som i sin tur kan reagera på detektionshändelsen och omvandla den till mätbara signaler, till exempel en ström eller spänning. Signalerna kan behandlas vidare av en dator för avläsning.



Figur 1.1: Flödesschema för hur en biosensor fungerar. Analyten fästs på receptorn och ger upphov till en fysikalisk förändring som transduktorn kan omvandla till en mätbar signal.

Biosensorer klassificeras enligt signalerna som transduktorn förmedlar och om analyten kan detekteras direkt eller indirekt [2]. Optiska biosensorer detekterar skillnader i absorption, fotoluminiscens och ljusets brytning på grund av att transduktorn förmedlar optiska signaler [3]. Vissa detektionshändelser ger dock inte upphov till en stark optisk signal och måste således mätas genom indirekt detektion. En molekyl kan fästas på analyten som en markör och utan att påverka själva reaktionen ger den upphov till en förstärkt signal. Till exempel en fluorescerande markörmolekyl kan exciteras genom energiöverföring från reaktionen mellan analyt och receptor [4] vilket ger upphov till fotoner som detekteras. Elektrokemiska biosensorer kan detektera analyter markörfritt, det vill säga direkt detektion utan extra markörmolekyler, eftersom de undersöker fysikalisk-kemiska förändringar som uppstår till följd av en reaktion.

Implementeringen av biosensorer finns bland annat inom de medicinska vetenskapsområ-

den som sjukdomsdiagnostisering och drogtestning. För att spara tid och resurser inom medicin och är det viktigt att kunna utföra tester hos patienten (eng. *point-of-care-testing*) istället för att transportera prov till ett laboratorium. Biosensorer kan användas inom diagnostisering genom att undersöka förekomsten av så kallade biomarkörer i patienten. Amerikanska *National Cancer Institute* definierar biomarkörer som en biologisk molekyl vars förekomst i kroppsvätskor eller vävnad signalerar förekomsten av ett biologiskt tillstånd eller en sjukdom [5]. Till exempel för att diagnostisera diabetes undersöks patientens nivå av glykosylerat hemoglobin som biomarkör [6]. Cancer och kardiovaskulära sjukdomar har även biomarkörer som kan detekteras. Kostnadseffektiva, massproducerade biosensorer som är känsliga, snabba och användarvänliga samt kan användas hos patienten skulle ha en stor inverkan på diagnostisering av dessa sjukdomar i ett tidigt skede [7].

1.1.1 Detektionsförmåga och pålitlighet

En biosensors förmåga att detektera analyter måste fastställas för att den uppmätta signalen, även kallad responsen, ska vara pålitlig. Detta görs utgående från ett antal olika kvantiteter: känslighet, selektivitet, specificitet, repeterbarhet, reproducerbarhet och detektionsgräns [8]. Genom att undersöka responsen som en funktion av analytkoncentration fås en så kallad kalibreringskurva, vars riktningskoefficient bestämmer *känsligheten* hos biosensorn. Från kalibreringen fås vidare också detektionsgränsen som är den lägsta koncentration var en analyt kan detekteras.

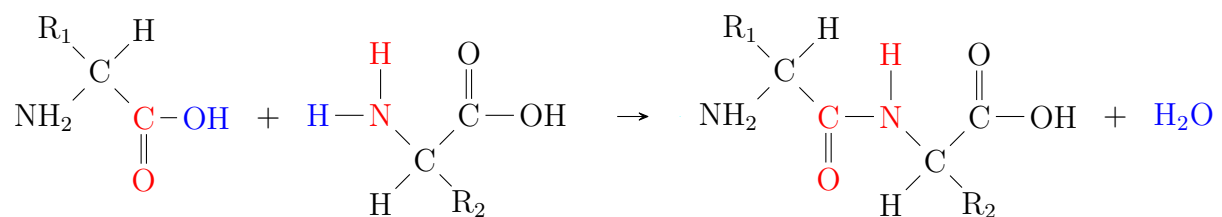
En biologisk analyt som är av intresse existerar sällan i vakuum utan tillhör oftast en större helhet. Blod innehåller många olika molekyler, bland annat glukos vars normala nivåer i en människas blodomlopp är kring 4,5 mM [9]. Trots detta kan en blodsockermätare enkelt detektera glukos och reagerar inte på någon annan molekyl, vilket betyder att sensorn har en hög *selektivitet*. Om selektiviteten hos en biosensor är 100%, det vill säga den detekterar endast analyten av intresse och ingenting annat, brukar biosensorn klassas som *specifik*.

Att kunna repetera mätningar med en biosensor och få likadan respons samt reproducera responsen med en annan sorts struktur är ett viktigt krav för pålitligheten [2]. Upprep-

ning av mätningar som undersöker samma analytkoncentrationer ger information om biosensorns *repetierbarhet* när strukturen och omständigheterna hålls identiska. Om samma mätning utförs under andra omständigheter och med varierande struktur är det istället *reproducerbarheten* hos biosensorn som kontrolleras.

1.2 Proteiner

Praktiskt taget alla biologiska processer som händer inuti en cell förmedlas av olika proteiner. Det finns 20 st. allmänt förekommande aminosyror som kan kovalent bindas ihop i olika sekvenser för att bilda proteiner. De aminosyror som bygger upp proteiner finns listade i Tabell 1.1. Aminosyror innehåller en aminogrupp ($-\text{NH}_2$) och en karboxylsyra ($-\text{COOH}$) samt en sidokedja ($-\text{R}$) som bestämmer deras egenskaper. Aminosyrorna binds ihop till proteiner med så kallade peptidbindningar, se Figur 1.2. Proteinkedjor kan variera mycket i storlek, från att innehålla några st. hopbundna aminosyror ända upp till tusentals. Om en kedja innehåller färre än 50 st. aminosyror brukar den istället benämnas peptid. Proteiners egenskaper och funktioner varierar mycket beroende på vilka aminosyror som finns i vilken sekvens [9]. Olika typer av proteiner är till exempel hormoner, antikroppar och enzymer. För att cellen ska kunna utföra processer och biokemiska reaktioner tillräckligt snabbt behövs katalysatorer och det är enzymerna som har denna uppgift.



Figur 1.2: Två aminosyror med de funktionella grupperna R_1 och R_2 binds till varandra genom att en aminogrupp reagerar med en karboxylgrupp och frigör en vattenmolekyl. Till följd av reaktionen bildas en peptidbindning ($-\text{CO} - \text{NH}-$) mellan aminosyrorna.

Om det i en proteins sekvensdomän upprepas leucin som var sjunde aminosyra är det möjligt för proteinet att sammanfogas med ett annat protein med samma sekvenser av leucin. De bildar då en slags spiralstruktur som kallas för leucinblixtlås (eng. *leucine zipper*) [10].

A	C	D	E	F
Alanin	Cystein	Asparaginsyra	Glutaminsyra	Fenylalanin
G	H	I	K	L
Glycin	Histidin	Isoleucin	Lysin	Leucin
M	N	P	Q	R
Metionin	Asparagin	Prolin	Glutamin	Arginin
S	T	V	W	Y
Serin	Treonin	Valin	Tryptofan	Tyrosin

Tabell 1.1: Allmänt förekommande aminosyror och deras bokstavsförkortning.

1.2.1 Proteiner som receptor och analyt

Funktionerna hos många proteiner innefattar deras förmåga att reversibelt binda till sig andra molekyler och skapa ett större komplex. Proteiner som är av analytiskt intresse kan detekteras med hjälp av en komplementär receptor som proteinerna kan binda sig till. Receptorer kan urskilja tusentals andra molekyler för att specifikt binda sig till deras komplementära analyt [9]. Detta gör det möjligt att skapa väldigt selektiva biosensorer när proteiner eller peptider ska detekteras.

När receptorer (R) och analyter (A) binder sig till, eller lösgör sig från, ett större komplex (C) handlar det om en kemisk jämviktsreaktion:



Detta medför att det finns en affinitetskonstant K_a som ger ett uttryck för styrkan hos bindningen mellan receptor och analyt:

$$K_a = \frac{[C]}{[R][A]} \quad (1.2)$$

där $[C]$, $[R]$ och $[A]$ är koncentrationen av komplex, fria receptorer och fria analyter.

Bindningen mellan analyter och receptorer är en detektionshändelse som kan upptäckas av en biosensor. Receptorerna kan till exempel vara ett lager av biomolekyler fästa på

en yta som har en viss elektrokemisk potential Φ_0 . Potentialen förändras när analyterna binder sig till receptorn. Vid ideala termodynamiska förhållanden kan potentialen vid ytan härledas från Gibbs fria energi och således fås Nernsts ekvation för den elektrokemiska potentialen [11]:

$$\Phi = \Phi_0 - \frac{k_B T}{e} \ln K_d \quad (1.3)$$

där k_B är Boltzmanns konstant, T är temperaturen, e är elementarladdningen och K_d är dissociationskonstanten, inversen av affinitetskonstanten K_a . Potentialförändringen kan nu skrivas som

$$\Delta\Phi = \Phi - \Phi_0 = \frac{k_B T}{e} \ln K_a = \frac{k_B T}{e} \ln \left(\frac{[C]}{[R][A]} \right) \quad (1.4)$$

Detektionselementet i biosensorn kan alltså antas vara receptorn R med en viss laddning q_1 medan analyten A har en laddning q_2 . Vid detektionshändelsen bildas ett nytt komplex C med laddningen q_3 och jämviktsreaktionen kan skrivas som



Denna förändring i receptorns laddning ($q_1 \rightarrow q_3$) borde kunna detekteras med en biosensor [12]. Potentialförändringen (1.4) kan nu approximeras som

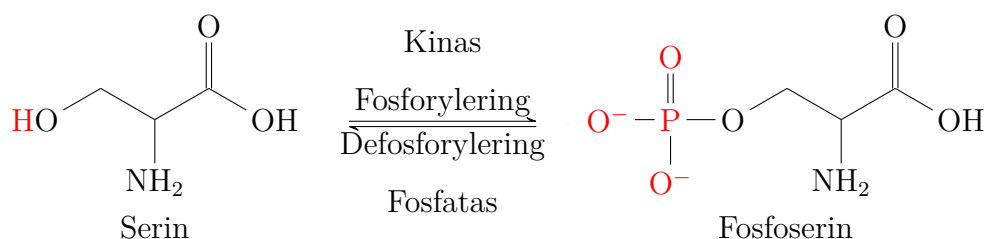
$$\Delta\Phi = \frac{k_B T}{e} \left(\operatorname{arcsinh} \left(\frac{q_3 [C]}{2q_2 [A]} \right) - \operatorname{arcsinh} \left(\frac{q_1 [R]}{2q_2 [A]} \right) \right). \quad (1.6)$$

genom att ta i beaktande laddningsförändringen [13]. Situationen med receptorer och analyter i en biosensor beskrivs som en så kallad Donnanjämvikt, där laddade partiklar rör sig nära semipermeabla membran [11].

1.2.2 Posttranslationell modifiering

Syntes av proteiner är en process som består av flera olika steg. I det så kallade translationssteget av syntesen används budbärar-RNA av cellens ribosomer för att koda aminosyresekvenser till fullständiga peptider eller proteiner. I golgiapparaten kan proteinerna vidare modifieras enzymatiskt genom tillsättning av olika molekyllgrupper, så kallade posttranslationella modifikationer (PTM). Med hjälp av dessa molekyllgrupper kan golgiapparaten sortera och skicka iväg proteinerna till deras slutdestination. Om defekter såsom inkorrekta modifikationer förekommer kan det leda till sjukdomar som följd av att proteinerna har sorterats och transporterats fel [14].

Golgiapparaten kan utföra ett flertal olika processer för att modifiera proteiner. Oftast tillförs någon molekylgrupp till proteinet, till exempel glykosylering tillfogar kolhydrater och acetylering fäster acetylgrupper. Golgiapparaten kan också utföra spjälkning av bland annat hormonproteiner för att de ska aktiveras [14]. En av de mest vanliga PTM är fosforylering [15] där enzymen kinas katalyserar överföringen av fosfatgrupper (PO_4^{3-}) till proteiner, se Figur 1.3. Modifikationen är reversibel och defosforyleringen katalyseras av fosfataser istället för kinaser.



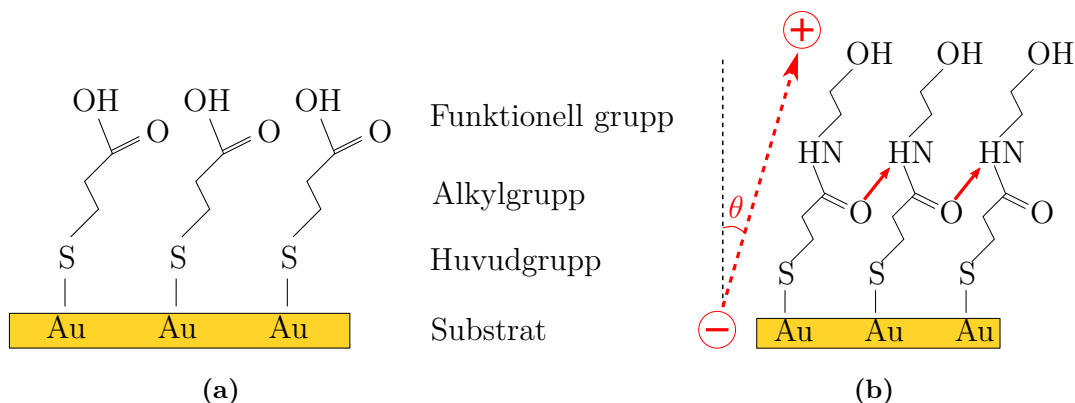
Figur 1.3: Fosforylering av serin med enzymet kinas. En väteatom i den funktionella sidogruppen ersätts med fosforylgrupp $\text{P}^+\text{O}_3^{2-}$. Den motsatta reaktionen katalyseras av enzymen fosfatas.

1.3 Självorganiserade monolager

I naturen förekommer självstyrd organisering av molekyler till olika strukturer eller mönster utan människans påverkan [16]. Ett självorganiserat monolager (eng. *self-assembled monolayer*, SAM) består av en samling molekyler som växelverkar och organiserats på ett substrat. Molekylerna organiserar sig tvådimensionellt längs med substratets plan vilket betyder att lagret har tjockleken av en molekyl. Den ena ändan av molekylen har en struktur som kan starkt interagera med substratets fasta yta och således hålls lagret stabilt bundet. Eftersom det är endast molekylen så kallade huvudgrupp som binder sig till substratet kan resten av molekylen struktur variera rätt mycket. Detta medför att användningen av SAM är vanlig inom forskning som behandlar modifiering av ytor [17]. Till exempel att fästa proteiner i en biosensor kan göras med hjälp av självorganiserade monolager.

Många olika processer ingår i självorganiseringen av monolager. Mellan huvudgruppen

och substratet uppstår en stark kemisk bindning, via till exempel adsorption, som gör det möjligt för resten av molekylen att organisera sig. Huvudgrupper som består av tioler ($-\text{SH}$) och adsorberas på gulds substrat är ett exempel på material som kan användas. Molekylerna i lösning adsorberas till substratet inom några minuter medan själva organiseringen kan ta flera timmar för att lagret ska bli tätt packat [18]. Den funktionella gruppen och kedjan som förenar de båda grupperna, ordnas med hjälp av elektrostatiske och van der Waals-krafter.



Figur 1.4: (a) Illustration av ett självorganiserat monolager på ett gulds substrat. (b) Vätebindningsnätverket i ett självorganiserat monolager där vinkeln θ beskriver avvikelserna av hela lagrets dipolmoment från ytans normal.

Ett självorganiserat monolager kommer att ha ett dipolmoment riktat från substratet mot de funktionella grupperna, som uppstår till följd av de starka $\text{Au} - \text{S}$ bindningarna. Om det till exempel har uppstått amidgrupper ($-\text{C}(=\text{O})\text{N}=\text{}$) i de enskilda molekylerna på grund av en reaktion, kan det uppstå ett nätverk av vätebindningar som binder ihop närliggande tioler, se Figur 1.4 (b). Vätebindningarnas dipolmoment är riktade från amidgruppens syre mot den närliggande amidgruppens väte. Om en elektrostatiske reaktion äger rum nära monolagret, till exempel en detekteringshändelse, kan lagret orientera sig och förändra dipolmomentets riktning jämfört med ytans normal [19].

Kapitel 2

Teori

2.1 Den organiska fälteffekttransistorn

Transistorn är en av de vanligaste komponenter som bygger upp moderna elektroniska apparater. En typisk transistor med tre elektroder och ett halvledarmaterial reglerar de laddningsbärare som flyter mellan två av elektroderna genom att styra den ström eller spänning som finns vid den tredje elektroden. Denna funktionalitet gör det möjligt bland annat att förstärka eller förminska signaler, vilket är en fundamental operation i dagens elektronik.

En fälteffekttransistor (FET) består i princip av fyra olika komponenter: elektroder (*source*, *drain* och *gate*) bestående av ett ledande material, ett dielektriskt material som isolator, ett halvledarmaterial som bildar en aktiv kanal för laddningsbärare att röra sig i, samt ett substrat som de andra komponenterna är uppbyggda på. I vissa FET:er kan halvledarmaterialet och substratet vara samma sak, t.ex. i en FET med metalloxid-halvledare (eng. *metal oxide semiconductor field effect transistor*, MOSFET). För att en FET ska kunna specificeras som organisk (OFET) ska åtminstone halvledaren bestå av organiska material, men även hela transistorn kan vara organisk. Fälteffekttransistorn reglerar strömflödet med hjälp av ett elektriskt fält som påverkar den aktiva kanalen i halvledarmaterialet där laddningsbärare flyter mellan source- (S) och drainelektroden (D). Det elektriska fältet uppkommer när en spänning appliceras på gateelektroden (G). En FET kan konstrueras på olika sätt när det kommer till placeringen av de olika komponenterna. I denna avhandling har experimenten utförts med en så kallad *top-gated*

OFET, där gateelektroden ligger ovanpå isolatorn som i sin tur är ovanför halvledaren och de två andra elektroderna, se Figur 2.1.

Strukturen hos en FET kan beskrivas som en kondensator där den isolerade elektroden och halvledarmaterialet är ledande plattor med ett avskiljande dielektriskt material. Denna struktur gör att fälteffekten och kapacitansen hör ihop, samt att kapacitansen är väldigt känslig för förändringar vid gränssytorna [20]. Detta kombinerat med transistorens välbekanta funktionalitet och portabilitet gör att fälteffekttransistorer har studerats intensivt de senaste åren som en möjlig biosensoranordning.

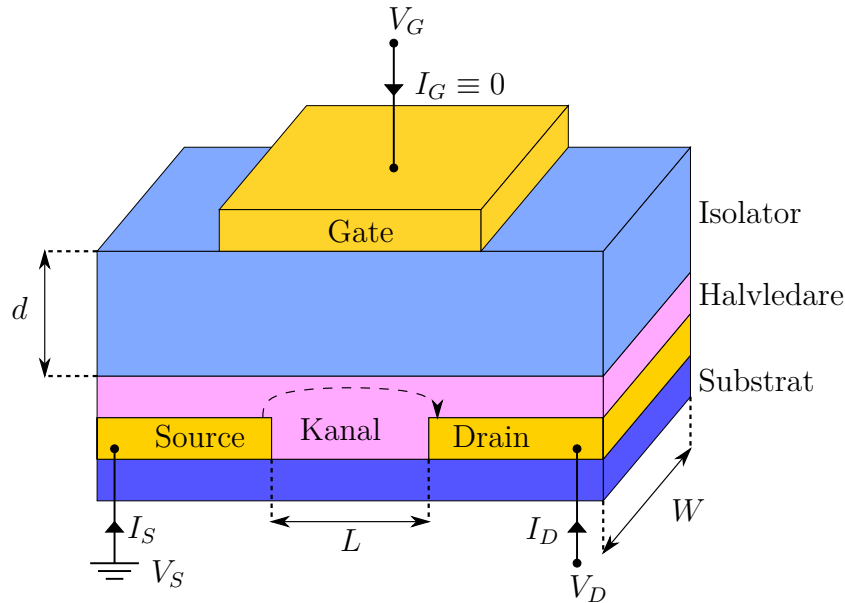
2.1.1 Grundläggande funktionalitet

Hur ström flyter i en OFET beror på halvledarmaterialet och vilka fria laddningsbärare som finns vid de olika gränssytorna. Den organiska halvledarens arbetsfunktion bestämmer vilka majoritetsladdningsbärare som finns i materialet. Positiva laddningar (hål) finns i halvledare med en aktiv p-kanal och negativa laddningar (elektroner) finns i halvledare med en aktiv n-kanal. Om en negativ (positiv) spänning V_G appliceras på gateelektroden i en OFET med p-kanal (n-kanal), kommer positiva (negativa) laddningar att ackumuleras vid gränssytan mellan isolatorn och halvledaren. En simultan negativ (positiv) spänning V_D på drainelektroden gör att hål (elektroner) injiceras till den aktiva kanalen i halvledaren och en ström flyter mellan source- och drainelektroderna. Oftast appliceras ingen spänning på sourceelektroden utan den hålls jordad. I en ideal transistor flyter ingen ström från gateelektroden till halvledaren, $I_G \equiv 0$ A.

En FET:s prestanda påverkas av olika faktorer. I området mellan de separerade source- och drainelektroderna bildas en aktiv kanal i halvledaren, med en viss kanalbredd W och -längd L . Antalet laddningsbärare som ackumuleras vid halvledargränssytan påverkas i sin tur av avståndet mellan gateelektroden och halvledaren, det vill säga tjockleken d på dielektrikumet. Som det tidigare konstaterats kan denna struktur liknas till en kondensator och kapacitansen per areaenhet formuleras som

$$C_A = \frac{C}{A} = \frac{\varepsilon}{d} \quad (2.1)$$

där permittiviteten $\varepsilon \equiv \varepsilon_r \varepsilon_0$ och bestäms av den elektriska konstanten ε_0 och det dielekt-



Figur 2.1: Schematisk illustration av en top-gated fälteffekttransistor.

riska materialets relativa permittivitet ϵ_r . Den applicerade spänningen på gateelektroden måste överstiga en så kallad tröskelspänning V_T för att driftström ska flyta i kanalen mellan source- och drainelektroden. Denna tröskel existerar till följd av att materialen i transistorn har olika arbetsfunktioner samt existensen av lokaliserade energitillstånd i gränssytan mellan isolatorn och halvledaren som måste fyllas före laddningar kan röras fritt i den aktiva kanalen. Appliceringen av V_G inducerar en laddning per areaenhet Q_A som kan beskrivas med hjälp av kondensatorns kapacitans per areaenhet C_A och potentialen som bildas mellan kondensatorplattorna:

$$Q_A = C_A(V_G - V_T). \quad (2.2)$$

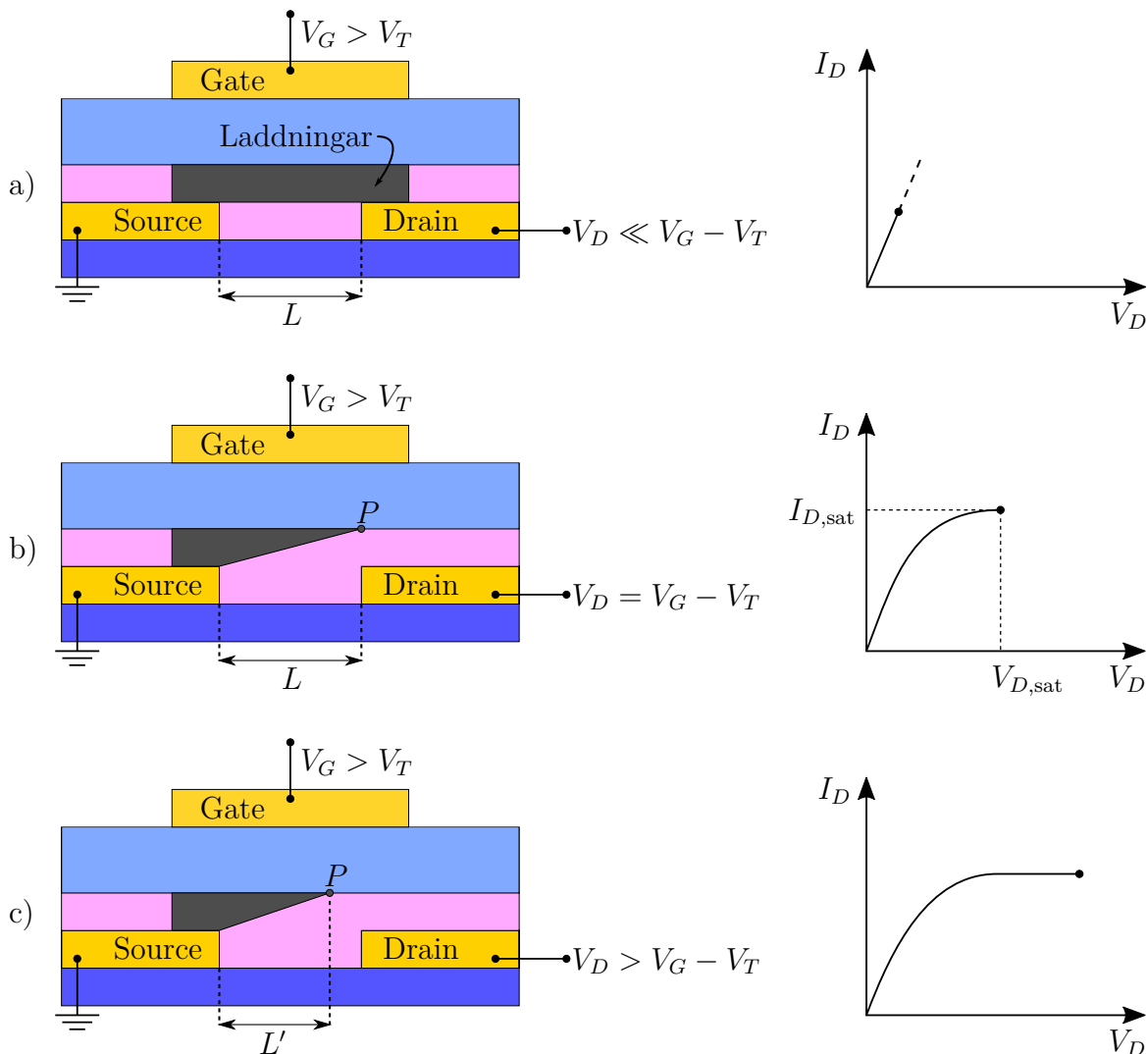
Om en spänning V_D appliceras på drainelektroden kommer potentialen i halvledaren att bero på positionen x i den aktiva kanalen. Denna potential kommer att vara 0 V vid sourceelektroden ($x = 0$) och lika med V_D vid drainelektroden ($x = L$). Således kan laddningen per areaenhet (2.2) utökas med en funktion $V(x)$:

$$Q_A = C_A(V_G - V_T - V(x)), \quad \text{där } V(x) = V_D \frac{x}{L} \quad (2.3)$$

2.1.2 Utmatningsegenskaper

För att en OFET ska fungera som önskat krävs att dess utmatningsegenskaper (eng. *output characteristics*) är tillräckligt bra. I utmatningsläget varieras V_D medan V_G hålls

konstant. Eftersom laddningarna ackumuleras vid olika positioner beroende på storleken av de applicerade spänningarna V_G och V_D samt transistorns tröskelspänning V_T kommer resistansen i kanalen att variera. Detta leder till att strömmen som flyter mellan source- och drainelektroden förändras. Till följd av detta finns två st. olika funktionsområden för transistor; det linjära området och mättnadsområdet.



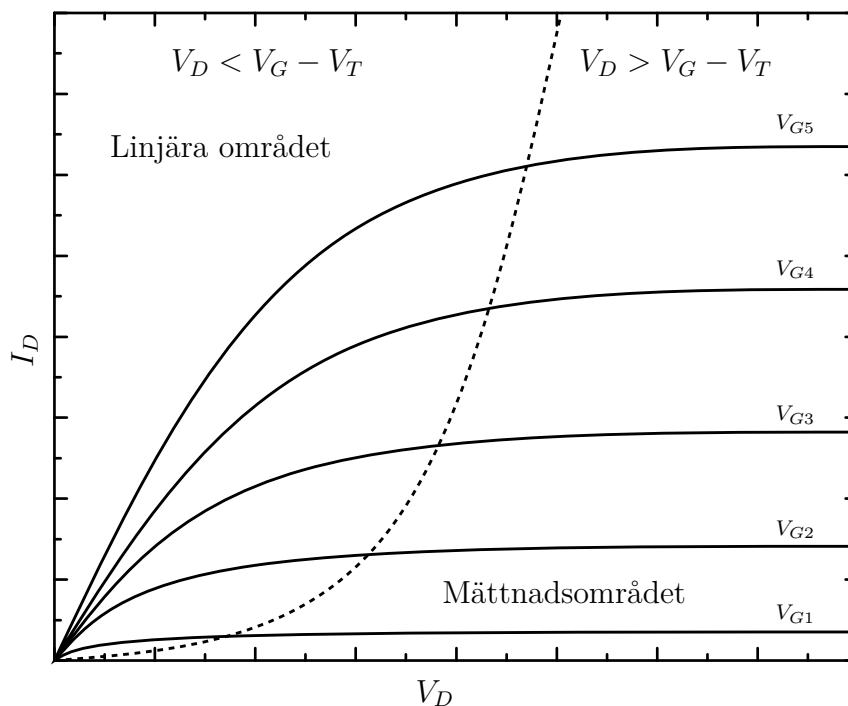
Figur 2.2: Schematisk illustration av laddningskoncentrationen samt ström- och spänningskarakteristik i de olika funktionsregionerna: a) det linjära området; b) *pinch-off* till mättnadsområdet; c) mättnadsområdet.

I båda områdena appliceras en konstant spänning V_G på gateelektroden som är större än tröskelspänningen V_T . När ingen spänning V_D appliceras på drainelektroden, finns det en likformigt fördelad laddningskoncentration i den aktiva halvledarkanalen, Figur

2.2 a). Appliceras en liten spänning $V_D \ll V_G - V_T$ så avtar laddningskoncentrationen nära drainelektroden och laddningar kan börja flöda i den aktiva kanalen. På grund av att spänningen V_D är liten hålls kanalresistansen i princip konstant. Detta medför att strömmen I_D är direkt proportionell mot V_D enligt Ohms lag:

$$I_D = \frac{1}{R}V_D, \quad (2.4)$$

därav det linjära området. Kanalresistansen är beroende av den applicerade gatespänningen där högre V_G ger större laddningskoncentration och mindre resistans, se Figur 2.3.



Figur 2.3: En typisk graf för utmatningsegenskaperna hos en OFET vid olika V_G . Från denna graf är det enkelt att se i vilket område transistoren opererar i för olika V_D och V_G . Vid låga V_D följer strömmen Ohms lag (2.4) och resistansen är beroende av V_G .

Om V_D höjs kommer färre laddningsbärare att injiceras i kanalen vilket leder till att resistansen ökar, det vill säga strömmen I_D ökar inte längre linjärt med V_D . När $V_D = V_G - V_T$ finns det inga laddningar vid drainelektroden enligt ekvation (2.3) och kanalen kläms av (eng. *pinch-off*) vid denna potentialpunkt P , Figur 2.2 b). Denna applicerade spänning $V_D = V_G - V_T$ kallas även pinch-off-spänning. Om V_D fortsätter att höjas, $V_D > V_G - V_T$, kommer pinch-off-punkten P att flyttas mot source- från drainelektroden och skapa ett utarmningsområde mellan P och drainelektroden, Figur 2.2 c). Detta medför

att inga rörliga laddningsbärare finns i området och en rymdladdningsbegränsad ström flyter genom utarmningsområdet. Strömmen I_D hålls vid ett konstant värde $I_{D,\text{sat}}$ trots att V_D höjs och transistorn befinner sig nu i mättnadsområdet. Om V_D höjs vidare kommer längden på kanalen L' att minska. Denna effekt är dock försumbar i transistorstrukturer med en tillräckligt lång aktiv kanal där inga kortkanalseffekter förekommer.

2.1.3 Överföringsegenskaper

När en OFET används som biosensor analyseras oftast dess överföringsegenskaper (eng. *transfer characteristics*). I överföringsläget varieras V_G medan V_D hålls konstant och strömmen I_D studeras. I en ideal transistor kan man analytiskt beräkna strömmen I_D som flyter från source- till drainelektroden. Vissa antaganden görs för att förenkla den analytiska härledningen: inga kortkanalseffekter förekommer och mobiliteten är konstant genom kanalen. Generellt kan en ström I som flyter genom en ledare med längden L , bredden W och höjden h beräknas enligt

$$I = qn_V v W h \quad (2.5)$$

där q är laddningen hos en laddningsbärare, n_V är antalet laddningsbärare per volymenhet och v är drifhastigheten. Genom att istället räkna med antalet laddningsbärare per areaenhet $n_A = n_V h$ fås den totala laddningen per areaenhet som $Q_A = q n_A$. Drifhastigheten kan beskrivas som $v = \mu E$, där μ är mobiliteten och E är det elektriska fältet som uppstår till följd av applicerad spänning. Strömmen som funktion av position x i kanalen kan nu beräknas enligt

$$I(x) = W \mu Q_A(x) E(x). \quad (2.6)$$

Vidare kan Q_A beskrivas enligt (2.3) och det elektriska fältet är förändringen av potentialen med avseende på positionen, $E(x) = dV(x)/dx$. Strömmen I_D genom kanalen blir nu

$$I_D(x) dx = W \mu C_A (V_G - V_T - V(x)) dV(x). \quad (2.7)$$

Denna differentialekvation kan enkelt integreras från source ($x = 0$) till drain ($x = L$) om man antar att I_D inte beror av x och använder $V(0) = 0$, $V(L) = V_D$:

$$I_D = \frac{W}{L} \mu C_A \left[(V_G - V_T) V_D - \frac{V_D^2}{2} \right]. \quad (2.8)$$

Strömmen I_D beror alltså på om transistorn befinner sig i det linjära området $V_D < V_G - V_T$ eller i mättnadsområdet $V_D \geq V_G - V_T$:

$$I_{D,\text{lin}} = \frac{W}{L} \mu C_A (V_G - V_T) V_D \quad \text{när } V_D < V_G - V_T, \quad (2.9)$$

$$I_{D,\text{sat}} = \frac{W}{2L} \mu C_A (V_G - V_T)^2 \quad \text{när } V_D \geq V_G - V_T. \quad (2.10)$$

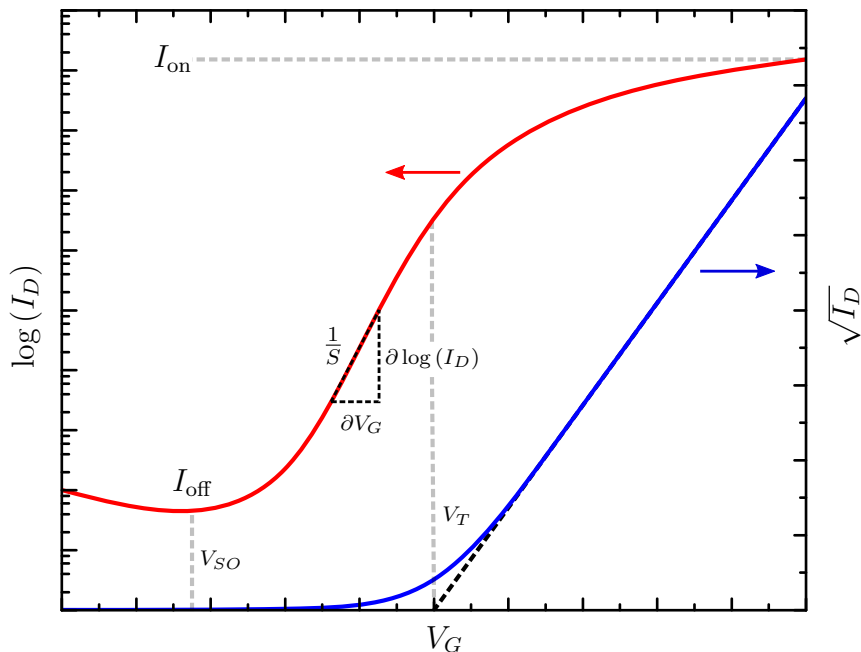
En transistors transkonduktans g_m beskriver förändringen av drainströmmen I_D med avseende på gatespänningen V_G när drainspänningen V_D är konstant:

$$g_m = \left. \frac{\partial I_D}{\partial V_G} \right|_{V_D} \quad (2.11)$$

Om transistorn befinner sig i det linjära området eller i mättnadsområdet påverkas också transkonduktansen enligt:

$$g_{m,\text{lin}} = \frac{W}{L} \mu C_A V_D \quad \text{i linjära området} \quad (2.12)$$

$$g_{m,\text{sat}} = \frac{W}{L} \mu C_A (V_G - V_T) \quad \text{i mättnadsområdet.} \quad (2.13)$$



Figur 2.4: En typisk graf för en OFETs överföringsegenskaper där de två y -skalorna $\log(I_D)$ och $\sqrt{I_D}$ gör det enkelt att approximera V_T , V_{SO} , S och $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$.

Halvledarens majoritetsladdningsbärare bestämmer vilken applicerad potential på V_G som tillåter en ström att flyta genom transistorn. Till exempel en ideal OFET med p-kanal

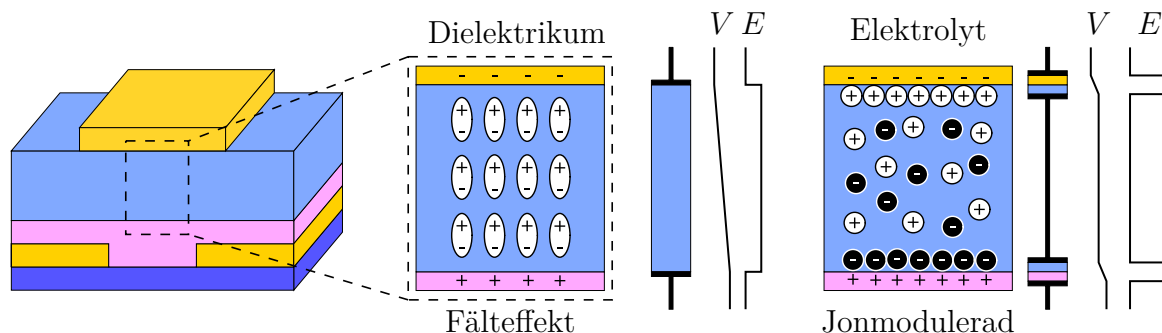
borde inte leda ström om $V_G \gg 0$. Transistorn slår på och börjar leda ström vid en viss gatespänning V_{SO} (eng. *switch-on voltage*) som definieras av drainströmmens minimum I_{off} [21]. När $V_G > V_{SO}$ flyter en diffusionsström och drainströmmen ökar exponentiellt ända tills tröskelspänningen V_T nås och ekvationerna (2.9)–(2.13) beskriver transistorns beteende. Området mellan V_{SO} och V_T kallas för undertröskelområdet (eng. *subthreshold region*) och inversen av riktningskoefficienten för $\log(I_D)$ mot V_G i detta område kallas ofta för undertröskelsvängning (eng. *subthreshold swing*) [22]:

$$S = \frac{\partial V_G}{\partial \log(I_D)} \quad (2.14)$$

Undertröskelsvängningen S beskriver den applicerade spänning V_G som behövs för att strömmen I_D ska öka en storleksordning. En annan viktig faktor i en FET:s överföringsoperation är förhållandet mellan den saturerade drainströmmen I_{on} och drainströmmens minimum I_{off} . Detta förhållande beror på vilket organiskt halvledarmaterial som används och kan variera mellan 10^2 och 10^8 [23]. Om I_{off} är högt betyder det finns en läckström i transistorn och laddningar kan flyta mellan source- och drainelektroden även om gatespänningen V_G är låg.

2.2 Jonmodulerad organisk FET

Isolatorn mellan gateelektroden och halvledaren i en OFET påverkar fälteffekten som transistorn utsätts för och transkonduktansen förbättras när isolatorns kapacitans ökar. Istället för att använda ett fast ämne som isolator i en OFET kan man ha en elektrolyt eller jonvätska som det dielektriska materialet. Denna OFET-struktur kallas för jonmodulerad OFET (eng. *ion-modulated OFET*, IMOFET eller *electrolyte-gated OFET*, EGOFET), även om man i princip frångår fälteffekten på grund av att jonerna kan röra sig fritt i isolatorn, vilket molekylerna i en fast isolator inte gör, se Figur 2.5. Jonerna bildar så kallade elektriska dubbelskikt (eng. *electrical double layer*, EDL) vid gränssytorna som fungerar likt plattkondensatorer. Möjligheten att använda en elektrolytlösning som den dielektriska isolatorn gör att man kan enkelt studera förändringar på ytor. Om dubbelskikten som bildas vid gränssytorna i transistorn utsätts för ytförändringar kommer även deras kapacitans att förändras, vilket påverkar den ström som flyter genom transistorn [24].



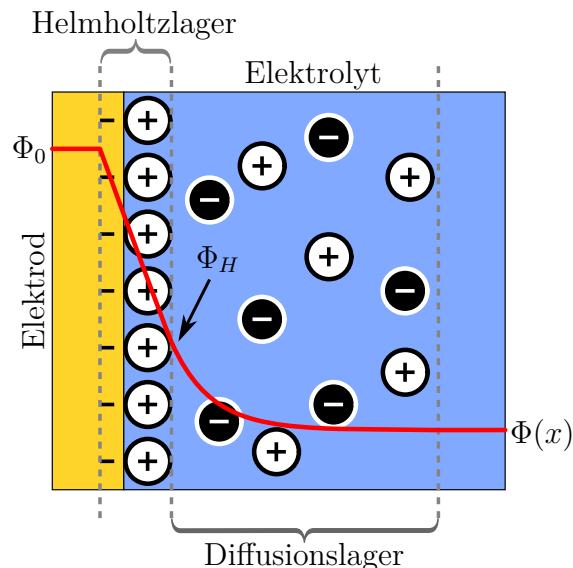
Figur 2.5: Schematisk illustration av en OFET samt hur laddningsrörelser, potential och energi skiljer sig åt i ett fast dielektrikum och en elektrolyt.

Det är viktigt att veta om elektrokemiska processer förekommer i en IMOFET med elektrolytlösning eftersom det förändrar transistorns funktionalitet. Organiska ämnen påverkas av elektrolyter i olika grad beroende på om ämnet är permeabelt eller inte. Om en permeabel organisk halvledare används i en IMOFET kan joner från elektrolyten penetrera och dopa halvledaren via redoxreaktioner. Kapacitansen kan nu inte längre beskrivas av en plattkondensator utan det handlar istället om en volymetrisk kapacitans [25]. Denna typ av OFET kallas för organisk elektrokemisk transistor (eng. *organic electrochemical transistor*, OECT). Med en impermeabel organisk halvledare borde dopning av materialet inte förekomma och transistoren opererar enligt det som beskrivs i avsnitt 2.1. Experiment med IMOFET:er har utförts för att bättre förstå hur elektrokemiska reaktioner kan påverka halvledarkanalens konduktivitet [26–28]. Om man inte överskrider elektrolytens elektrokemiska spänningsfönster samt använder en impermeabel organisk halvledare som inte lätt dopas av elektrolytens joner borde elektrokemiska reaktioner inte förekomma i transistoren.

I en jonmodulerad transistor som ska interagera med biomolekyler eller levande vävnad används oftast vatten som elektrolyt. I transistoren kommer vattnet vid elektrodgränsetorna då att utsättas för olika spänningsfall. Vattnets elektrokemiska spänningsfönster har rapporterats att vara 1,23 V, då vatten kan oxideras, $2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$, vid 0,571 V och reduceras, $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$, vid $-0,658$ V. Vilka spänningar som kan appliceras på elektroderna som är i direkt kontakt med vatten behöver alltså begränsas för att undvika uppkomsten av faradaiska strömmar och elektrokemiska reaktioner [27].

2.2.1 Det elektriska dubbelskiktet

Elektriska dubbelskikt uppstår när ytan av en elektrod kommer i kontakt med en vätska och beskriver den potentialskillnad som finns vid gränsytan. Laddningarna på elektrodens yta skapar ett skikt som med hjälp av Coulombkraften attraherar motsatt laddade joner i vätskan. Olika modeller finns för att teoretiskt förklara elektriska dubbelskikt, varav en är Sternmodellen [29], som bygger på de tidigare modellerna av Gouy-Chapman och Helmholtz [30]. Enligt Sternmodellen finns det ett tunt Helmholtzlagret vid gränsytan mellan elektrod och elektrolyt samt ett Gouy-Chapman-diffusionslager som sträcker sig från Helmholtzlagret in mot elektrolytens bulk [31], se Figur 2.6.



Figur 2.6: Schematisk illustration av ett elektriskt dubbelskikt. Laddningarna vid gränsytan bildar ett Helmholtzlagret där den applicerade potentialen Φ_0 avtar linjärt. I diffusionslagret har jonkoncentrationen Boltzmannfördelning, vilket betyder att potentialen avtar exponentiellt in i elektrolytens bulk.

Helmholtzmodellen beskriver två lager av motsatta laddningar på ett visst avstånd d från varandra. Potentialen $\Phi(\mathbf{r})$ kan beskrivas med Poissons ekvation

$$\nabla^2 \Phi(\mathbf{r}) = -\frac{\rho(\mathbf{r})}{\varepsilon} \quad (2.15)$$

där $\rho(\mathbf{r})$ är laddningsdensiteten vid positionen \mathbf{r} och ε är permittiviteten. Potentialen i Helmholtzlagret förändras endast i en dimension och inga laddningar finns mellan lagren vilket ger att laddningsdensiteten $\rho(\mathbf{r}) = 0$ och Poissons ekvation (2.15) förenklas till

Laplaces ekvation för en dimension:

$$\frac{\partial^2 \Phi(x)}{\partial x^2} = 0. \quad (2.16)$$

Genom att lösa (2.16) med giltiga randvillkor och antagandet att avståndet mellan lagren x är mycket mindre än deras area A fås potentialen i Helmholtzlagret som

$$\Phi_H(x) = \frac{Qx}{A\varepsilon} \quad (2.17)$$

där Q är laddningen på elektrodytan. Potentialen är linjärt beroende av avståndet x vilket ger det avtagande i Helmholtzlagret som syns i Figur 2.6. Detta är helt analogt med en vanlig kondensator och genom att ersätta $C = Q/\Phi_H$ fås kapacitansen per areaenhet i Helmholtzlagret som

$$C_H = \frac{C}{A} = \frac{\varepsilon}{x}.$$

Enligt Gouy-Chapmanmodellen är kapacitansen i dubbelskikten inte konstant utan beror på den applicerade potentialen samt elektrolytens jonkoncentration. Fördelningen av jonerna följer en Boltzmannfördelning vilket ger att koncentrationen $n_j(\mathbf{r})$ av en jon j vid en position \mathbf{r} fås som

$$n_j(\mathbf{r}) = n_j^0 e^{\frac{-q_j \Phi(\mathbf{r})}{k_B T}} \quad (2.18)$$

där n_j^0 är jonkoncentrationen i elektrolytens bulk, $q_j = z_j e$ är jonernas laddning, k_B är Boltzmanns konstant och T är temperaturen. Laddningsdensiteten i diffusionslagret blir då

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_j q_j n_j(\mathbf{r}) = \sum_j q_j n_j^0 e^{\frac{-q_j \Phi(\mathbf{r})}{k_B T}}. \quad (2.19)$$

Insättning av (2.19) i ekvation (2.15) ger den så kallade Poisson-Boltzmannekvationen

$$\varepsilon \nabla^2 \Phi(\mathbf{r}) = - \sum_j q_j n_j^0 e^{\frac{-q_j \Phi(\mathbf{r})}{k_B T}}. \quad (2.20)$$

Detta är en icke-linjär differentialekvation men genom att approximera exponentialfunktionen med första ordningens Taylorutveckling ($e^x \approx 1 + x$ för $0 < x \ll 1$) kan den linjäriseras:

$$\varepsilon \nabla^2 \Phi(\mathbf{r}) \approx - \sum_j q_j n_j^0 \left(1 - \frac{q_j \Phi(\mathbf{r})}{k_B T} \right).$$

Termen $\sum_j q_j n_j^0 = 0$ eftersom en elektrolyt innehåller lika stor koncentration av positivt och negativt laddade joner. Poisson-Boltzmannekvationen kan nu förenklas till

$$\nabla^2 \Phi(\mathbf{r}) = \kappa^2 \Phi(\mathbf{r}) \quad \text{där} \quad \kappa^2 = \sum_j \frac{q_j^2 n_j^0}{\varepsilon k_B T}.$$

Från detta fås den karakteristiska Debye-längden λ_D :

$$\lambda_D = \kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon k_B T}{\sum_j q_j^2 n_j^0} \right)^{1/2} \quad (2.21)$$

som har enheten meter och beskriver hur långt en laddningsbärarens elektrostatiska effekt verkar i en lösning. Detta sätter en gräns på hur långt ifrån detektionselementet en laddad analyt i elektrolytlösning kan detekteras [32]. För att förenkla Poisson-Boltzmannekvationen är det skäl att begränsa den till symmetriska elektrolyter som har en typ var av anjoner och katjoner med samma laddningsmängd z [33]. Genom att tillämpa detta samt att begränsa systemet till en dimension fås

$$\frac{d\Phi(x)}{dx} = - \left(\frac{8k_B T n^0}{\varepsilon} \right)^{1/2} \sinh \left(\frac{ze\Phi(x)}{2k_B T} \right). \quad (2.22)$$

Nära en platt gränssyta såsom mellan elektrod och elektrolyt med låg applicerad potential ($\Phi_0 \leq 50/z$ mV vid 25 °C) kan (2.22) förenklas så att $\Phi(x)$ i Gouy-Chapman-diffusionslagret beror på Debye-längden enligt

$$\Phi_{GC}(x) = \Phi_0 e^{-\kappa x}. \quad (2.23)$$

Ett uttryck för kapacitansen per areaenhet C_{GC} i diffusionslagret kan också fås genom att tillämpa Gauss lag med potentialderivatan (2.22) och blir

$$C_{GC} = \left(\frac{2z^2 e^2 \varepsilon n^0}{k_B T} \right)^{1/2} \cosh \left(\frac{ze\Phi_0}{2k_B T} \right). \quad (2.24)$$

Sternmodellen kombinerar potentialerna i Helmholtzlagret (2.17) och Gouy-Chapmanlagret (2.23), vilket är illustrerat i Figur 2.6. De skilda lagrens kapacitanser, (2.2.1) och (2.24), fungerar som kondensatorer i serie vilket ger att den totala kapacitansen per areaenhet C_S enligt Sternmodellen blir

$$\frac{1}{C_S} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{CG}}. \quad (2.25)$$

I en IMOFET finns det två st. elektriska dubbelskikt, en vid gateelektroden och en vid halvledaren. Om gateelektroden blir negativt polariserad rörs elektrolytens katjoner mot den och anjonerna rör sig mot halvledaren. Detta medför två st. kapacitanser, C_G vid gateelektroden och C_{OSC} vid halvledaren, som kan antas följa Sternmodellen för elektriska dubbelskikt. Inget elektriskt fält förekommer i elektrolytens bulk och kapacitansen som delvis reglerar strömmen genom transistorn är således inte beroende av avståndet

mellan gateelektroden och halvledaren. Istället fungerar de elektriska dubbelskikten som kondensatorer i serie och den totala kapacitansen blir

$$C_{\text{tot}} = \left(\frac{1}{C_G} + \frac{1}{C_{OSC}} \right)^{-1} = \frac{C_G C_{OSC}}{C_G + C_{OSC}} \quad (2.26)$$

och C_{tot} begränsas av dubbelskiktet med den mindre kapacitansen. I en IMOFET varierar C_{tot} typiskt mellan $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ och $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, vilket beror på de enskilda dubbelskiktens avstånd, 0,01 nm till 0,1 nm, som är beroende av gränssytornas laddningsseparation [34]. Detta medför att en IMOFET fungerar med låga applicerade spänningar samt producerar höga strömmar.

2.2.2 Detektion genom kapacitansförändring

En möjlig struktur för en IMOFET-baserad biosensor är att detektionselementet fästs på gateelektroden i form av ett biolager medan source- och drainelektroden samt halvledaren används som transduktor. Den biokemiska reaktion som ska analyseras händer vid gateelektroden vilket förändrar strömmen I_D som flyter mellan source- och drainelektroden. Överföringen av laddningar vid en sådan reaktion leder till en förändring i potentialen $\Delta\Phi$ vid gateelektroden som kan beskrivas av ekvation (1.6). Strömmen I_D genom en FET kan beskrivas med ekvationerna (2.9) och (2.10), men i en IMOFET måste de elektriska dubbelskikten som elektrolyten bildar beaktas genom kapacitansen (2.26). Biolagret som byggs upp på gateelektroden bidrar också med en kapacitans C_{BIO} men denna kan sammanslås med C_G [11]. Gateelektrodens potential förändras enligt $V_G + \Delta\Phi$ när biolagret utsätts för en biokemisk reaktion och transistor-ekvationerna som beskriver drainströmmen blir nu beroende av potentialförändringen samt elektrolytens seriekapacitanser [35].

Överföringsekvationerna (2.9) och (2.10) blir för en IMOFET

$$I_{D,\text{lin}} = \frac{W}{L} \mu C_A (V_{G,\text{eff}} - V_T) V_D \quad \text{när } V_D < V_{G,\text{eff}} - V_T \quad (2.27)$$

$$I_{D,\text{sat}} = \frac{W}{2L} \mu C_A (V_{G,\text{eff}} - V_T)^2 \quad \text{när } V_D \geq V_{G,\text{eff}} - V_T \quad (2.28)$$

där en effektiv spänning $V_{G,\text{eff}}$ används istället för gatespänningen V_G för att beakta dubbelskiktens potentialförändring. Spänningen vid gränssytan mellan elektrolyten och

halvledaren kommer att påverkas både av V_G och potentialförändringen $\Delta\Phi$ som uppstår när en analyt fästs på gateelektroden. Detta medför en inducerad laddning Q vid halvleder- och elektrolytskiktet:

$$Q = C_{OSC}V_{G,\text{eff}} = C_{\text{tot}}(V_G + \Delta\Phi).$$

Från detta fås en ekvation för den effektiva gatespänningen som påverkar IMOFET:ens aktiva kanal:

$$V_{G,\text{eff}} = \frac{C_G}{C_G + C_{OSC}} (V_G + \Delta\Phi). \quad (2.29)$$

Insättning av (2.29) i (2.27) och (2.28) ger följande ekvationer för hur drainströmmen påverkas av en potentialförändring på gateelektroden:

$$I_{D,\text{lin}} = \frac{W}{L} \mu C_A \frac{C_G}{C_G + C_{OSC}} \left[V_G + \Delta\Phi - \left(1 + \frac{C_{OSC}}{C_G} \right) V_T \right] V_D \quad \text{när } V_D < V_{G,\text{eff}} - V_T \quad (2.30)$$

$$I_{D,\text{sat}} = \frac{W}{2L} \mu C_A \frac{C_G^2}{(C_G + C_{OSC})^2} \left[V_G + \Delta\Phi - \left(1 + \frac{C_{OSC}}{C_G} \right) V_T \right]^2 \quad \text{när } V_D \geq V_{G,\text{eff}} - V_T \quad (2.31)$$

där $C_A = C_{OSC}/A_{OSC}$. Drainströmmen som flyter genom en IMOFET är alltså väldigt beroende av de elektriska dubbelskikt som uppstår vid elektrolytens gränssytor. Skiktens kapacitanser är känsliga till ytförändringar som i sin tur påverkar drainströmmen, vilket gör IMOFET:er till ypperliga transduktorer.

Om detektionselementet byggs upp med hjälp av ett självorganiserat monolager kan också vätebindningsnätverkets dipolmoment förändra gateelektrodens arbetsfunktion och således bidra till en känslig detektion [11]. Monolagrets orientering kan påverkas av bindingsreaktioner vilket leder till att vinkeln mellan tiolmolekylernas ryggrad och guldtytans normal förändras, som i sin tur kan förändra arbetsfunktionen och tröskelspänningen. IMOFET-baserade biosensorer utan ett självorganiserat monolager har således visats vara mindre känsliga än de som kan utnyttja vätebindningsnätverket [19].

2.3 Detektionsgräns

En biosensors förmåga att detektera olika analyter beror på många faktorer och egenskaper, bland annat dess detektionsgräns (eng. *limit of detection*, LOD). Oftast mäts en analyt genom att utsätta biosensorn för större koncentrationer av den, vilket orsakar en förändring i mätinstrumentets respons. Idealt blir responsen R linjärt beroende av analytkoncentrationen C :

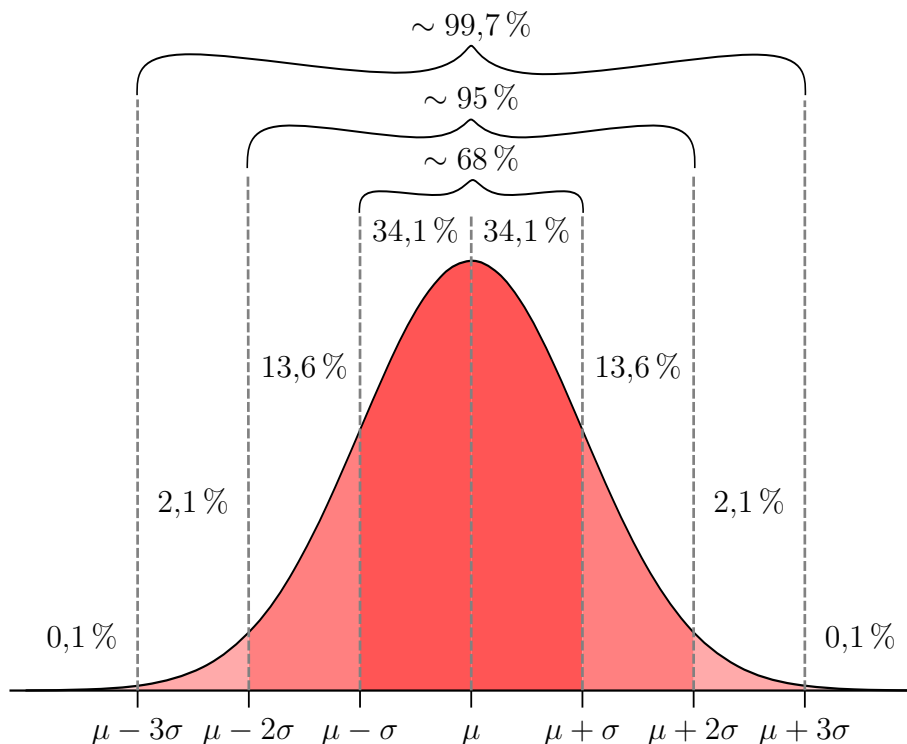
$$R = aC + b \quad (2.32)$$

där riktningskoefficienten a och konstanten b bestäms utgående från mätresultaten. Detta kallas även för biosensors kalibreringskurva och borde innehålla minst fem st. olika koncentrationer som innefattar åtminstone två storleksordningar [8]. Värdet på riktningskoefficienten a brukar användas som ett mått på biosensors känslighet [11] och högre värden betyder känsligare anordning. Genom att undersöka kalibreringskurvan för olika biosensorer med en identiskt anordningsstruktur fås information om responsens repeterbarhet medan kalibreringskurvan från annorlunda strukturer fastställer reproducerbarheten hos responsen. Eftersom mängden av detektorelement i en biosensor är begränsad finns det ett maximalt antal analyter som kan detekteras. Biosensorn blir således mättad vid höga koncentrationer av analyt och responsen blir konstant. Den linjära modellen kan dock tillämpas vid de lägre koncentrationerna och ger information om biosensors egenskaper, bland annat detektionsgränsen [36].

Experimentella resultat kommer att innehålla mätfel och osäkerheter som om möjligt ska elimineras, till exempel genom upprepning. Om alla mätresultat upprepas tillräckligt många gånger kan det antas att de är normalt fördelade kring ett medelvärde μ med en standardavvikelse σ . Det vill säga responsen har en Gaussisk täthetsfunktion:

$$f(R) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(R-\mu)^2}{2\sigma^2}}. \quad (2.33)$$

I en blank mätning tillsätts ingen analyt och biosensorn borde inte ge en respons, $R = 0$. Dessa behövs för att enkelt urskilja om respons från mätningar med analyt duger som resultat, det vill säga att det inte handlar om falsk negativ eller falsk positiv respons. Genom att utföra tillräckligt många blanka mätningar fås mätvärden som är fördelade enligt (2.33) och en gräns för responsen kan bestämmas från detta. Gränsen R_L fås som



Figur 2.7: Normalfördelning kring medelvärdet μ med standardavvikelsen σ . Från fördelningen följer den så kallade 68-95-99,7-regeln där 68 %, 95 % och 99,7 % av värdena hittas en, två respektive tre standardavvikelser från medelvärdet.

ett antal standardavvikelser från den blanka mätningens medelvärde:

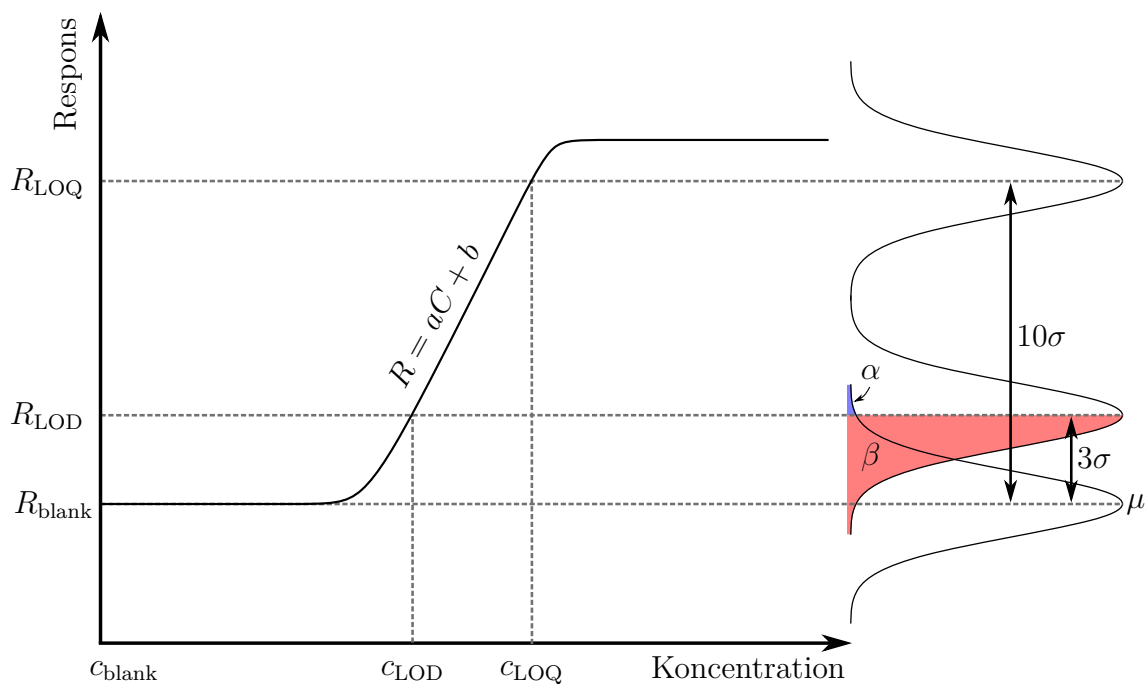
$$R_L = R_{\text{blank}} + k\sigma_{\text{blank}} \quad (2.34)$$

där k är en numerisk faktor och bestäms utgående från den förtroendenivå som önskas [1]. Om en blank mätning ger en respons, $R \neq 0$, är det en falsk positiv mätning som förekommer med en viss sannolikhet α . I det motsatta fallet när en mätning med analyt inte ger en respons, $R = 0$, trots att reaktionen har ägt rum är det en falsk negativ mätning som förekommer med sannolikheten β . Idealt ska både falsk positiv och negativ respons elimineras men när det kommer till mätningar av låga koncentrationer analyt som inte ger väldigt stora förändringar i respons blir det svårt. Genom att använda $k = 3$ som den numeriska faktorn fås $\alpha = 0,15\%$ och $\beta = 50\%$, se Figur 2.8. Detta betyder att vid en koncentration som motsvarar R_L när $k = 3$ är sannolikheten för en falsk positiv respons väldigt liten medan hälften av mätvärdena motsvarar falska negativa händelser. Den motsvarande koncentrationen c_{LOD} kallas för detektionsgräns och definieras mera specifikt som den lägsta koncentration var en analyt kan detekteras men inte nödvändigtvis kvantifieras. Kvantifieringsgränsen (eng. *limit of quantification*, LOQ) är istället den

lägsta koncentration var analyten kan kvantifieras med en viss noggrannhet och fås när $k = 10$ [37].

$$R_{\text{LOD}} = R_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{blank}} \quad (2.35)$$

$$R_{\text{LOQ}} = R_{\text{blank}} + 10\sigma_{\text{blank}} \quad (2.36)$$



Figur 2.8: En typisk graf över hur responsen från en biosensor förändras med ökande analytkoncentration och tillhörande gränser för responsen. Vid koncentrationen som motsvarar detektionsgränsen (LOD) har analyten orsakat en reaktion som detekterats av biosensorn. Sannolikheten för en falsk positiv mätning vid R_{LOD} är $\alpha = 0,15\%$ medan en falsk negativ mätning inträffar med sannolikheten $\beta = 50\%$. Vid kvantifieringsgränsen (LOQ) kan mängden av detekterad analyt fastställas med tillräcklig noggrannhet.

Kapitel 3

Experimentellt

Denna avhandling baserar sig till stor del på experimentellt arbete. De prov och anordningar som användes i experimenten tillverkades enligt protokollet beskrivet i avsnitt 3.1. Mätupställningen som användes beskrivs i avsnitt 3.2 medan själva mätproceduren finns i avsnitt 3.3.

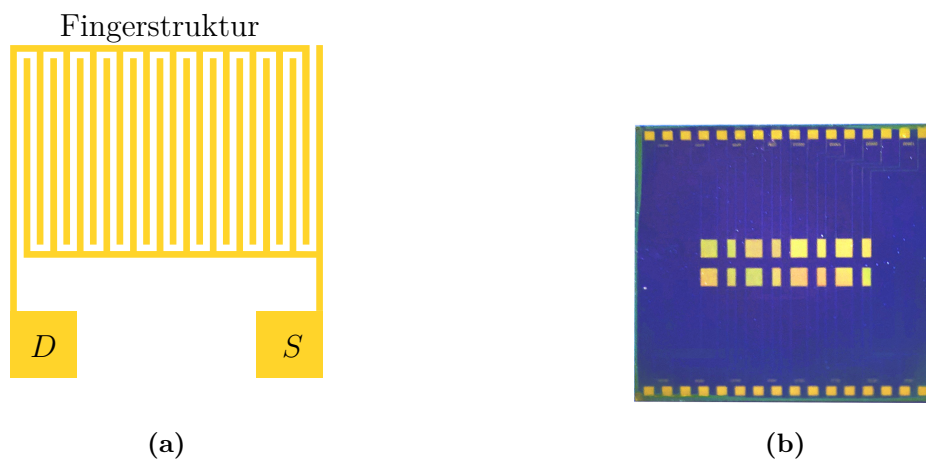
3.1 Provtillverkning

Biosensorn som tillverkades för att utföra experimenten består av två olika delar som tillsammans bildar en jonmodulerad fälteffekttransistor. Transistorns funktionaliserade gateelektrod är biosensorns detektorelement där den önskade biokemiska reaktionen äger rum. Resistorn är transistorns source- och drainelektrod samt den organiska halvledaren och fungerar som biosensorns transduktor. Tillsammans med vatten som elektrolyt bildar dessa komponenter en IMOFET där resistorn omvandlar en biokemisk reaktion till mätbara elektriska signaler. Tillverkning och funktionalisering av provens komponenter följer till stor del protokollet som användes av Holzer et al. [38]. Tillverkningen av proven har varierat och uppdaterats under projektets gång men alla mätresultat normaliseras till en anordningsspecifik parameter för att undvika variation mellan olika prov.

3.1.1 Resistor

IMOFET:ens resistorkomponent fungerar som transduktor och byggs upp på ett substrat av kisel och kiseldioxid (Si/SiO₂) med elektroder av guld (Au) fästa med hjälp av ett lager krom (Cr) eller titan (Ti), beroende på tillverkaren. Si/SiO₂ – Cr – Au substraten har

totalt 16 st. fingerstrukturer med source- och drainelektroder som har varierande förhållanden mellan kanalbredd och -längd, $W/L \approx 2000$ till $W/L \approx 27000$. Si/SiO₂ – Ti – Au substraten har 5 st. fingerstrukturer vilka alla har $W/L \approx 2000$. Bägge variationer av substraten är tillverkade med elektronstrålelitografi. Dessa substrat rengjordes i ultraljudsbad i tre steg: först 10 min i avjoniserat vatten, efteråt 10 min i aceton och slutligen 10 min i isopropanol. Substraten blåstes torra med komprimerad kvävgas.



Figur 3.1: (a) Illustration av en fingerstruktur. (b) Fotografi av ett Si/SiO₂ – Cr – Au-substrat som har 16 st. fingerstrukturer med varierande W/L .

Den organiska halvledaren som bildar det aktiva lagret i resistorn är poly(3-hexyltiofen-2,5-diyl) (P3HT) som löstes antingen i klorbensen (CB) eller diklorbensen (DCB) med viktförhållandet 2,6 mg/mL eller 4 mg/mL och filtrerades genom ett 0,2 μm filter. I vissa mätningar användes en variant av halvledaren dopad med zinkoxid (P3HT/ZnO). Denna lösning applicerades på substraten med hjälp av rotationsbestrykning i 60 s med en rotationshastighet på 2000 rpm varefter de värmebehandlades i 1 h vid temperaturen 80 °C.

3.1.2 Funktionaliserad gateelektrod

IMOFET:ens gateelektrod fungerar som biosensors detektorelement och byggs upp på en Kapton plastfilm med ett 50 nm tjockt guldlager fäst med hjälp av titan. Dessa substrat rengjordes med isopropanol i ett ultraljudsbad i 10 min. Substraten blåstes torra med komprimerad kvävgas varefter de rengjordes med plasma i 2 min.

För att kemisorptera ett självorganiserat monolager (SAM) på substraten placerades

de i en lösning bestående av en 10 mM blandning med ett 10:1 förhållande av tiolerna 3-merkaptopropionsyra (3-MPA) och 11-merkaptoundekansyra (11-MUA) löst i etanol. Substraten placerades i denna lösning under kväveatmosfär och rumstemperatur ($\sim 25^\circ\text{C}$) i 18 h. Efter kemisorptionen kan dessa substrat förvaras i etanol upp till 15 dagar i 4°C .

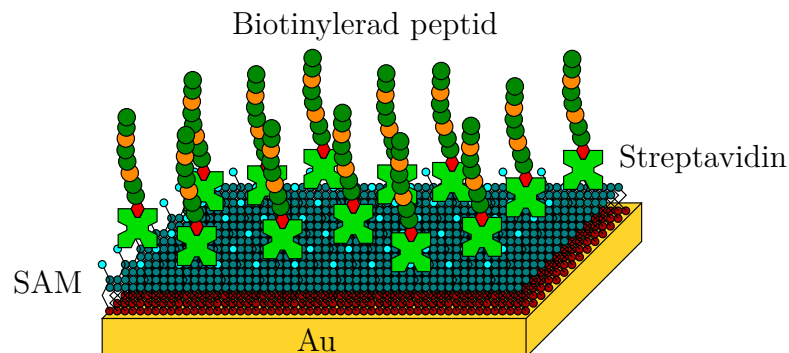
Aktivering av de SAM-modifierade substraten gjordes med en blandning av 0,2 M N-(3-dimetylaminopropyl)-N'-etylkarbodiimidhydroklorid (EDC) och 0,05 M N-hydroxisulfosuccinimid (sulfo-NHS) löst i HPLC-graderat vatten, vilket har filtrerats med högupplösande vätskekromatografi (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) för att vara så rent och fri från joner som möjligt. Substraten var i denna lösning i 2 h varefter de sköljdes av med en buffert bestående av 10 mM 4-(2-hydroxietyl)-1-piperazinetansulfonsyra (HEPES, pH 7,4), 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM etylendiamintetraättiksyra (EDTA), 5 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100. Denna buffert kallas härnäst för buffert 1 (B1) och användes för att skölja av substraten efter alla följande steg.

Substraten placerades efteråt i en avidin- (AV) eller streptavidinlösning (SAV), rekonstituerad med fosfatbuffrad saltlösning (PBS) till 1 mg/mL och utspädd till 100 $\mu\text{g/mL}$ med B1. Substraten var i denna lösning i 2 h. För att passivera molekyler som inte reagerade med (S)AV placerades substraten i 1 M etanolaminhydroklorid (EA) löst i B1 och fick stå i 1 h. Blockeringen gör det också möjligt för ett nätverk av vätebindningar att uppstå i det självorganiserade monolagret, då syret från en molekyl kan bindas till vätet i en annan.

Tre olika peptider designade av H. Härmä vid Åbo Universitet och syntetiserade av Pepmic Co., Ltd (Suzhou, Kina) användes i dessa experiment [39]. Två av peptiderna fungerar som receptorer och fästes således på gateelektroden för att fungera som detektorelement. Peptiderna är positivt laddade och har en biotinmolekyl fäst i N-terminalen för att kunna bindas till (strept)avidinet. Den enda skillnaden mellan peptiderna är att en av serinmolekylerna har genomgått fosforylering. Den sista peptiden är negativt laddad och är komplementär till receptorpeptiderna. Den kan binda sig till den icke-fosforylerade receptorpeptiden med hjälp av ett leucinblixtlås och kan således användas som analyt. Analytpeptiden förbereds genom att spädas ut med förhållandet 1:10 i B1 till 16 st olika koncentrationer, från 100 nM till 0,1 μM . Nedan finns peptidernas aminosyresekvenser:

- Receptorpeptid (MO5) för positiv kontrollmätning:
 - Biotin-REELRKRRRAELRRRSAQLRQRREQLRRRSANLRKE
- Fosforylerad receptorpeptid (pMO5) för negativ kontrollmätning:
 - Biotin-REELRKRRRAELRRR(pS)AQLRQRREQLRRRSANLRKE
- Komplementär peptid (Pep28) som analyt:
 - KDTLQAETDQLEDEKSALQTEIANLLKEKEKLEFIL

De avaktiverade (strept)avidinfunktionaliserade substraten placerades i önskad receptorpeptid utspätt i B1 till $0,5\ \mu\text{M}$ och var där i 2 h. De färdigt funktionaliserade gateelektrodena med fullständigt biolager kan förvaras i B1 upp till 5 dagar i $4\ ^\circ\text{C}$ efter denna aktiveringsprocess. Höjden på biolagret kan uppskattas vara $\sim 40\ \text{nm}$, där monolagrets höjd är några Å [38], streptavidinet är $\sim 6\ \text{nm}$ högt beroende på dess orientering [40] och den biotinylerade peptidens höjd är $\sim 33\ \text{nm}$, baserat på de olika aminosyrornas storlek [41].



Figur 3.2: Illustration av en funktionaliserad gateelektrod. Ovanpå det självorganiserade monolagret fästs streptavidin som kan binda till sig biotinylerade peptider.

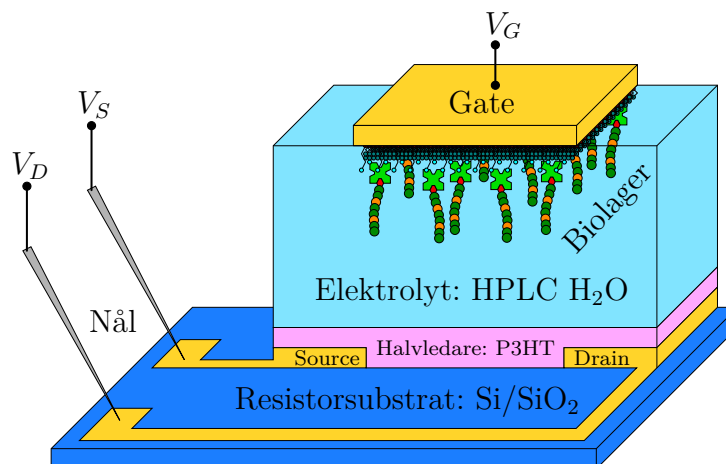
En annan negativ kontrollmätning gjordes även genom att mätta biolagret på den funktionaliserade gateelektroden med biotin. De avaktiverade avidinfunktionaliserade substraten placerades i en biotinlösning utspätt med B1, så att biotinkoncentrationen är minst fyra gånger högre än avidinkoncentrationen, $> 400\ \mu\text{g/mL}$. Denna koncentration valdes eftersom varje avidinmolekyl kan binda till sig högst fyra st. biotinmolekyler med hög affinitet, $K_a = 10^{15}\ \text{M}$ [42]. Ingen specifik bindning av analyterna till det funktionaliserade biolagret borde förekomma eftersom den biotinylerade receptorpeptiden kan inte

fästas i mättade avidinmolekyler och som följd har analytpeptiden ingen bindningsplats.

De båda negativa kontrollmätningarna representerar olika biokemiska reaktioner. Eftersom ingen analyt kan specifikt bindas till den funktionaliserade gateelektroden borde den erhållna responsen vara noll jämfört med den positiva kontrollmätningen. De är inte blanka mätningar som beskrivs i avsnitt 2.3, men deras respons kan ändå användas för att bestämma en detektionsgräns för den positiva kontrollmätningen enligt ekvation (2.36).

3.2 Mätuppställning

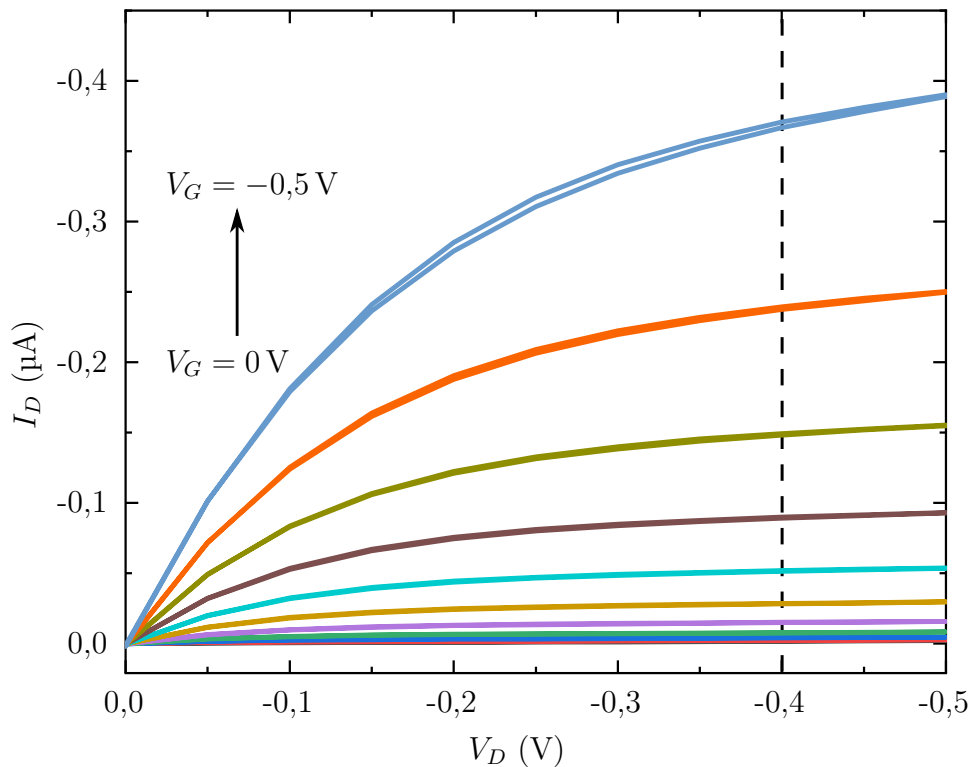
Resistorn och den funktionaliserade gateelektroden bildar tillsammans med elektrolyten en IMOFET. Som elektrolyt användes HPLC-graderat vatten som har en Debye-längd $\lambda_D = 100$ nm [19]. Elektrolyten sätts i en plastbehållare som har limmats fast på resistorn. Behållaren rymmer ca 200 μ l vätska och täcker endast resistorns fingerstrukturer, där halvledarens aktiva kanal bildas. Ovanpå vattenbehållaren sätts den funktionaliserade gateelektroden, se Figur 3.3. Arealen av gateelektroden som är i kontakt med vattnet är ca 0,6 cm². Mätuppställningen baserade sig långt på mätsystemet Torsi et al. sammanställde för biosensormätningar [8]. Strömmen genom transistorn bestämdes som en funktion av spänningen med hjälp av ett datorstyrt mätinstrument (Keithley eller Agilent) samt egenprogrammerad LabVIEW-mjukvara.



Figur 3.3: Schematisk illustration av mätuppställningen. Gateelektroden är fäst i en klämma och är kopplad till samma mätinstrument som source- och drainelektroderna.

3.3 Mätprocedur

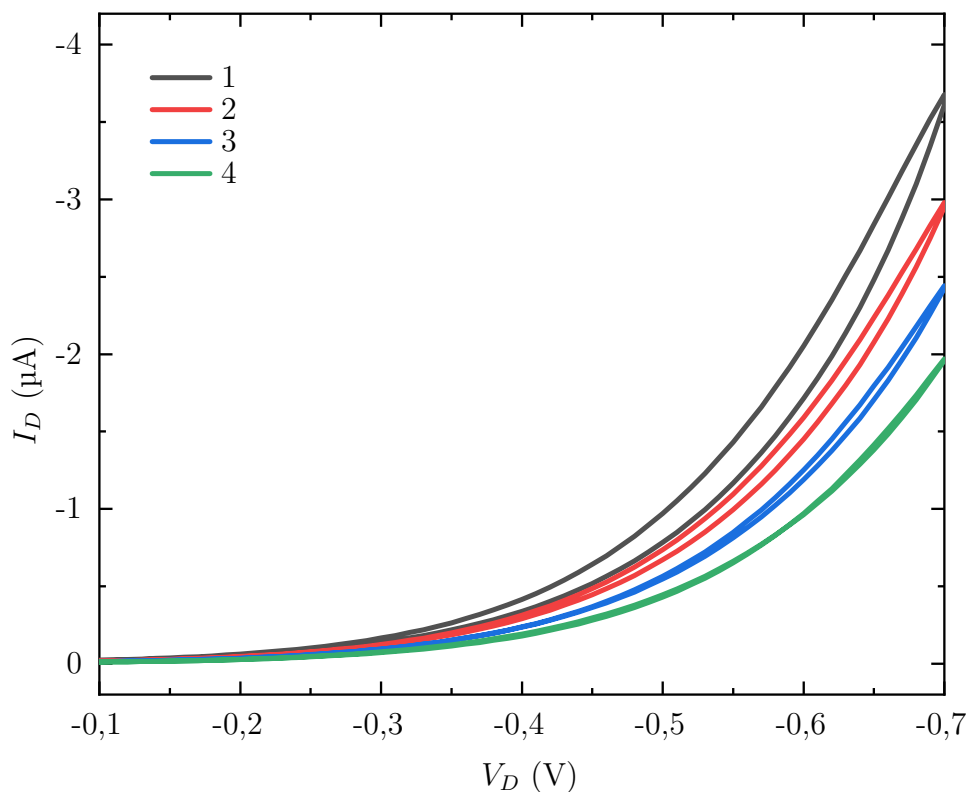
Mätproceduren följde till stor del Macchias protokoll för elektrisk detektion med en IMOFET-biosensor [43]. Transistorns ström- och spänningsegenskaper bestämdes genom att utföra mätningar både i utmatnings- och överföringsläge. Dessa gjordes med en ofunktionaliserad gateelektrod, som hädanefter kallas för referenselektrod. De flesta mätningar har utförts med en Kapton-Ti-Au elektrod som referens men vid senare mätningar användes istället rent guld som referenselektrod. Utmatningsegenskaper bestämdes genom att mäta drainströmmen I_D när drainspänningen V_D varierades från 0,0 V till $-0,5$ V och tillbaka till 0,0 V i steg om 0,05 V. Denna variation utfördes för 10 st. olika gatespänningar V_G som likadant varierades från 0,0 V till $-0,5$ V i steg om 0,05 V. Detta gjordes för att se om transistorn fungerade väl och för att bestämma vid vilken V_D transistorn befann sig i mättnadsområdet, se Figur 3.4.



Figur 3.4: Ett exempel på en transistors utmatningskaraktistik när V_D varierades från 0,0 V till $-0,5$ V för 10 st. olika V_G . Från dessa mätningar valdes $V_D = -0,4$ V som den konstanta drainspänningen för överföringsmätningarna, eftersom transistorn befann sig i mättnadsområdet.

I överföringsläget hölls V_D konstant på $-0,4$ V och transistorn befann sig i mättnadsom-

rådet. V_G varierades nu från $-0,1$ V till $-0,7$ V och tillbaka till $-0,1$ volt i steg om $0,01$ V. Detta gjordes först med referenselektroden för att igen se om transistorn fungerade väl samt för att stabilisera den. Stabilisering krävs eftersom I_D sjunker med tiden vartefter överföringsmätningar görs, vilket leder till att de känsliga kontrollmätningarna kan ge felaktiga resultat. Därför ska strömmen genom transistorn vara så stabil som möjligt före kontrollmätningarna påbörjas. Stabiliseringsperioden kan ta några timmar upp till några dagar, beroende på transistorn. Under denna stabiliseringsperiod kommer den organiska halvledaren att degraderas av luft, vatten och de applicerade spänningarna. Genom att observera maxvärdet av drainströmmen $I_{D,\max}$ för varje variation av V_G kunde transistorns degradering observeras. $I_{D,\max}$ kunde ändra från ca -40 μA till -2 μA under en stabilisering. När förändringen av $I_{D,\max}$ blev tillräckligt liten mellan ett antal påföljande överföringsmätningar ansågs stabiliseringen med referenselektroden vara tillräcklig.



Figur 3.5: Ett exempel på en transistors överföringskaraktistik när V_G varierades från $-0,1$ V till $-0,7$ V i stabiliseringsmätningar med referenselektroden. Strömmens absoluta värde samt hysteres minskade när transistorn stabiliserades.

Efter avklarad stabilisering påbörjas kontrollmätningarna. Önskad funktionaliserad gate-

elektrod används nu istället för referenselektroden. En liten stabiliseringsperiod kan behövas eftersom biolagret på den nya elektroden kan fortsättningsvis påverka transistorn. På grund av att analyten är utspädd i B1 ska systemet även stabiliseras till bufferten. Detta görs genom att placera gateelektroden i en 100 μL stor droppe med B1 utan analyt i 10 min varefter den sköljs försiktigt av med HPLC H_2O och placeras tillbaka på resistorns vattenbehållare för att igen stabiliseras med överföringsmätningar. Denna process upprepas tills förändringen av $I_{D,\text{max}}$ mellan två av dessa inkubationer blir tillräckligt liten och systemet ansågs anpassat till bufferten. En av dessa stabila överföringsmätningar används som baslinje för kontrollmätningarna. Elektrisk detektion av analyten påbörjas efter den sista stabiliseringen och en bra baslinje har uppnåtts. Detta görs på samma sätt som inkubation av gateelektroden i B1 förutom att nu används analytlösningarna istället. Alla kontrollmätningar påbörjas med den lägsta koncentrationen, 0,1 zM eller 1 zM. I den positiva kontrollmätningen borde $|I_D|$ öka efter varje inkubation med en högre koncentration av analyt, eftersom positiva laddningar på ytan neutraliseras. När $|I_D|$ inte längre ökar med koncentrationen är ytan mättad med analyt och experimentet kan avslutas. I de negativa kontrollmätningarna borde $|I_D|$ inte öka med koncentrationen av analyt och experimentet kan avslutas när samma slutkoncentration som i de positiva kontrollen nåtts eller när alla koncentrationer använts. Experimentet avslutas med att mäta överföringsegenskaper med referenselektroden för att observera om transistorn har degraderats under kontrollmätningarna.

Kapitel 4

Resultat och diskussion

4.1 Behandling av resultat

4.1.1 Normalisering

Ström- och spänningsegenskaperna varierade mycket mellan de olika transistorerna som användes. Detta beror på en hel del olika fenomen som har att göra med hur transistoren är uppbyggd, till exempel kunde vissa transistorer ha haft ett tjockare aktivt lager än andra. Detta gav upphov till att strömmen $I_{D,\max}$ för baslinjen kunde variera mellan $1\ \mu\text{A}$ och $10\ \mu\text{A}$ beroende på transistoren. Genom att göra en normalisering av mätresultaten elimineras stora delar av denna variation, dock inte allt. Den uppmätta drainströmmen $I_{D,c}$ för en viss koncentration c jämförs med baslinjeströmmen I_0 som är drainströmmen när ingen analyt har blivit tillsatt. Hur strömmen $I_{D,c}$ har ökat eller minskat jämfört med baslinjeströmmen fås enligt

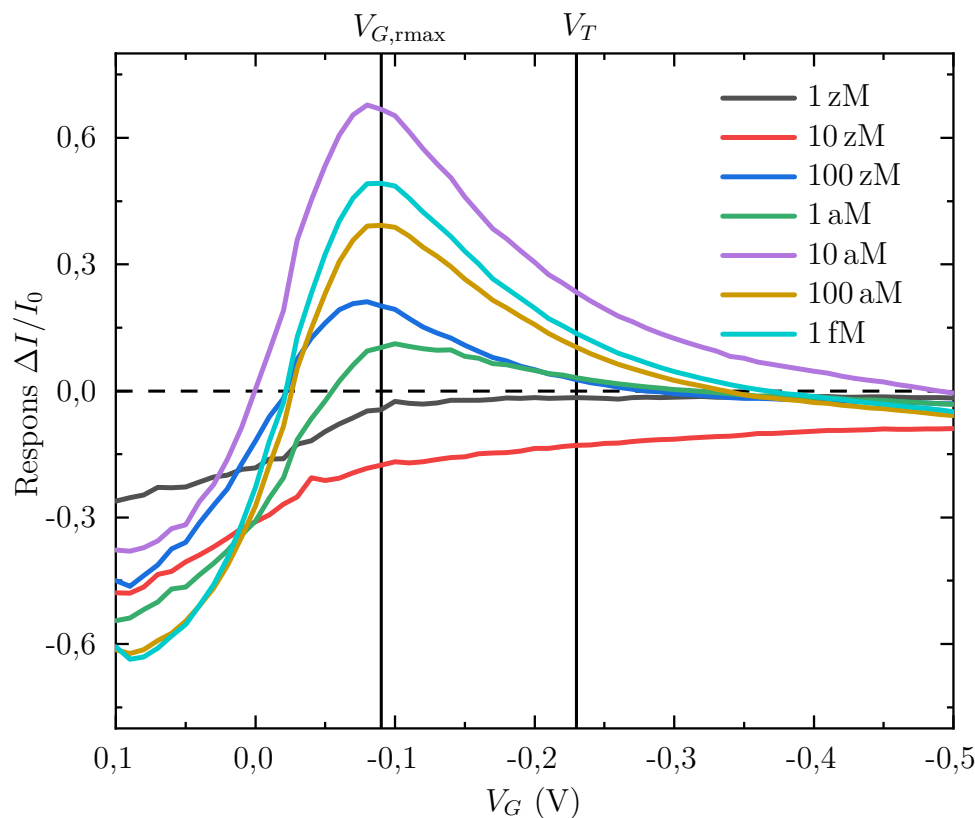
$$\frac{\Delta I_c}{I_0} = \frac{I_{D,c} - I_0}{I_0}, \quad (4.1)$$

och används som biosensorns respons R . Alla strömmar i normaliseringsekvationen är beroende av V_G och responsen beror mycket på vid vilken gatespänning strömmarna undersöks. I de positiva kontrollmätningarna syns de största värden på $\Delta I_c/I_0$ i transistorens undertröskelområde, vilket gör det området mest attraktivt för analysering. Eftersom tröskelspänningen varierar mellan olika transistorer kommer också undertröskelområdet att hittas vid olika V_G . Responsen $\Delta I_c/I_0$ undersöks som en funktion av V_G för att enkelt identifiera var dess högsta värde erhålls och $V_{G,\max}$ är då spänningen där den maximala responsen hittas. I de negativa kontrollmätningarna borde responsen hållas nära 0, vilket

gör det svårt att direkt hitta den spänning som är jämförbar med den positiva kontrollmätningens $V_{G,\text{rmax}}$. Men genom att använda sig av spänningsskillnaden $\Delta V_G = V_T - V_{G,\text{rmax}}$ fås ett jämförbart V_G där responsen undersöks för de negativa kontrollmätningarna.

4.1.2 Positiv kontroll med icke-fosforylerad peptid

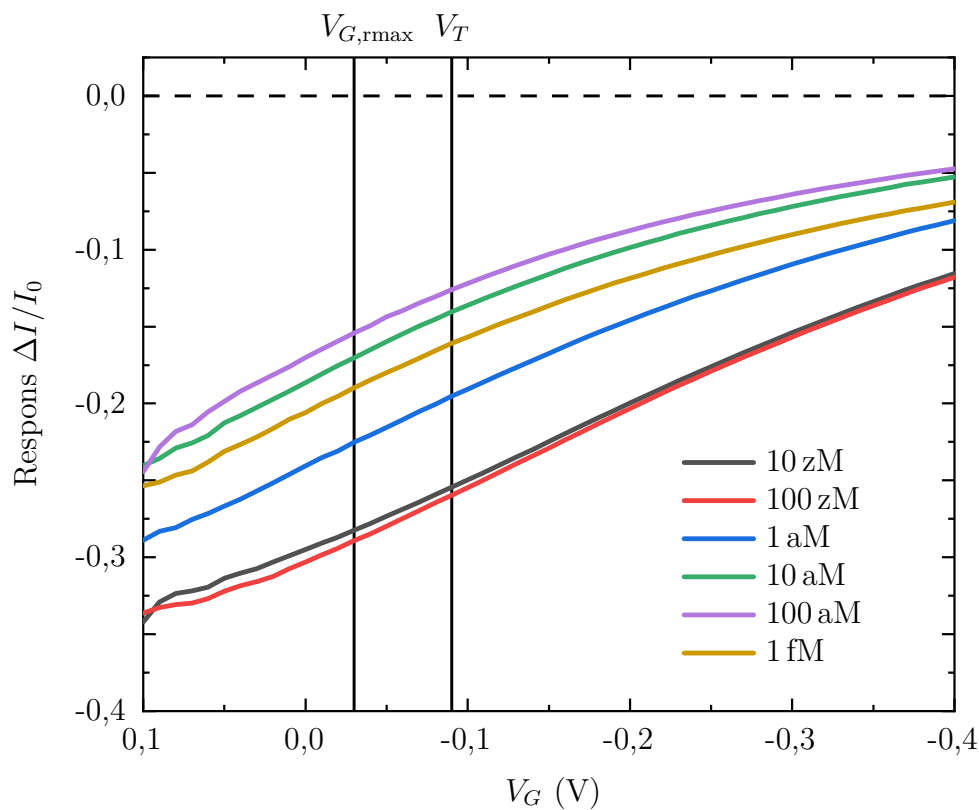
Det positiva kontrollexperimentet utfördes med en icke-fosforylerad peptid (MO5) fäst på den funktionaliserade gateelektroden. Som analyt användes den komplementära peptiden (Pep28) löst i buffert B1. Efter att en fullständig mätning med de relevanta koncentrationerna utförts, undersöks responsen som funktion av gatespänningen för att hitta det $V_{G,\text{rmax}}$ var ökningen av $|I_D|$ har varit störst, se Figur 4.1. Tröskelspänningen i denna mätning var för varje koncentration kring $V_T = -0,23\text{ V}$ och det är tydligt att största skillnaden i strömmen syns just i undertröskelområdet.



Figur 4.1: Responsen $\Delta I/I_0$ som funktion av V_G när spänningen varieras från 0,1 V till $-0,5\text{ V}$, för sju st. olika koncentrationer av analyt. $V_{G,\text{rmax}}$ väljs godtyckligt som ett medeltal av den spänning där responsen för de olika koncentrationerna är högst. I denna mätning var medelvärdet av tröskelspänningen $V_T = -0,23\text{ V}$ och $V_{G,\text{rmax}}$ valdes till $-0,09\text{ V}$.

4.1.3 Negativ kontroll med fosforylerad peptid

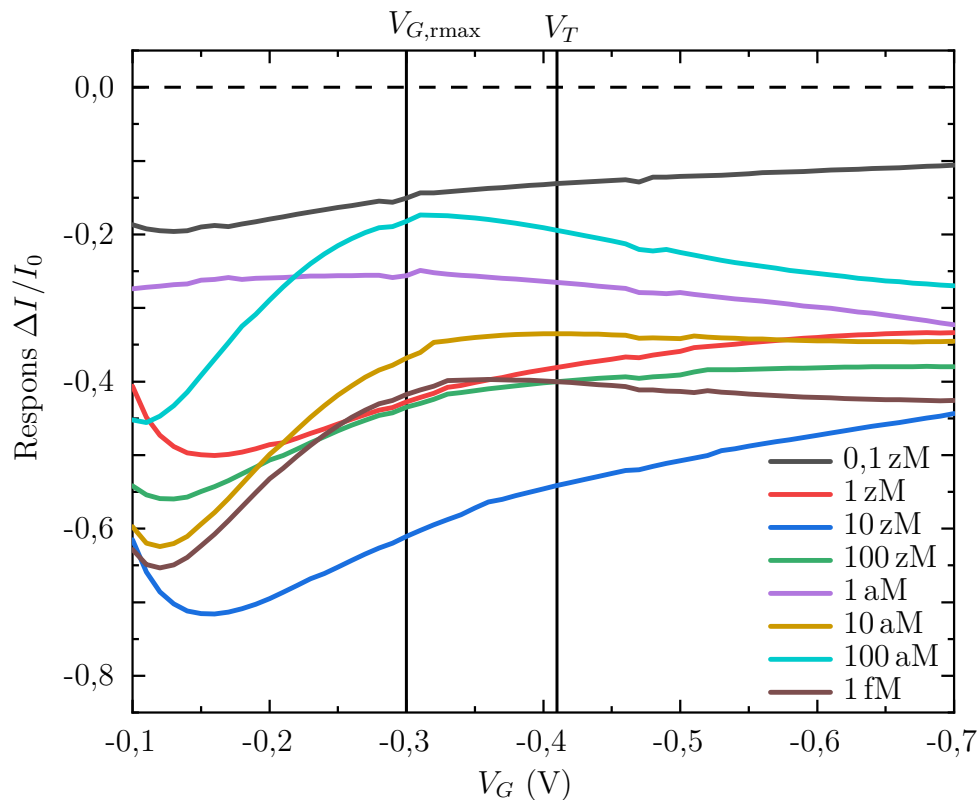
Ett av de negativa kontrollexperimenten utfördes med en fosforylerad peptid (pMO5) fäst på den funktionaliserade gateelektroden. Som analyt användes den komplementära peptiden (Pep28) löst i buffert B1. Efter att en fullständig mätning med de relevanta koncentrationerna utförts, undersöks responsen som funktion av gatespänningen, Figur 4.2. Denna negativa kontrollmätning undersöker om det är möjligt för den komplementära peptiden att binda sig till den funktionaliserade elektrodytan, antingen specifikt i den fosforylerade receptorpeptiden eller icke-specifikt i någon annan del av biolagret.



Figur 4.2: Responsen $\Delta I/I_0$ som funktion av V_G när spänningen varieras från 0,1 V till $-0,4$ V, för sex st. olika koncentrationer av analyt. Strömmen genom transistoren när responsen är 0 är samma som baslinjeströmmen, det vill säga när 0 M av analyt har tillsatts. $V_{G,rmax}$ väljs godtyckligt i undertröskelområdet så att det motsvarar spänningen för de positiva kontrollmätningarnas högsta respons. I denna mätning var medelvärdet av tröskelspänningen $V_T = -0,09$ V och $V_{G,rmax}$ valdes till $-0,03$ V.

4.1.4 Negativ kontroll med biotinmättad yta

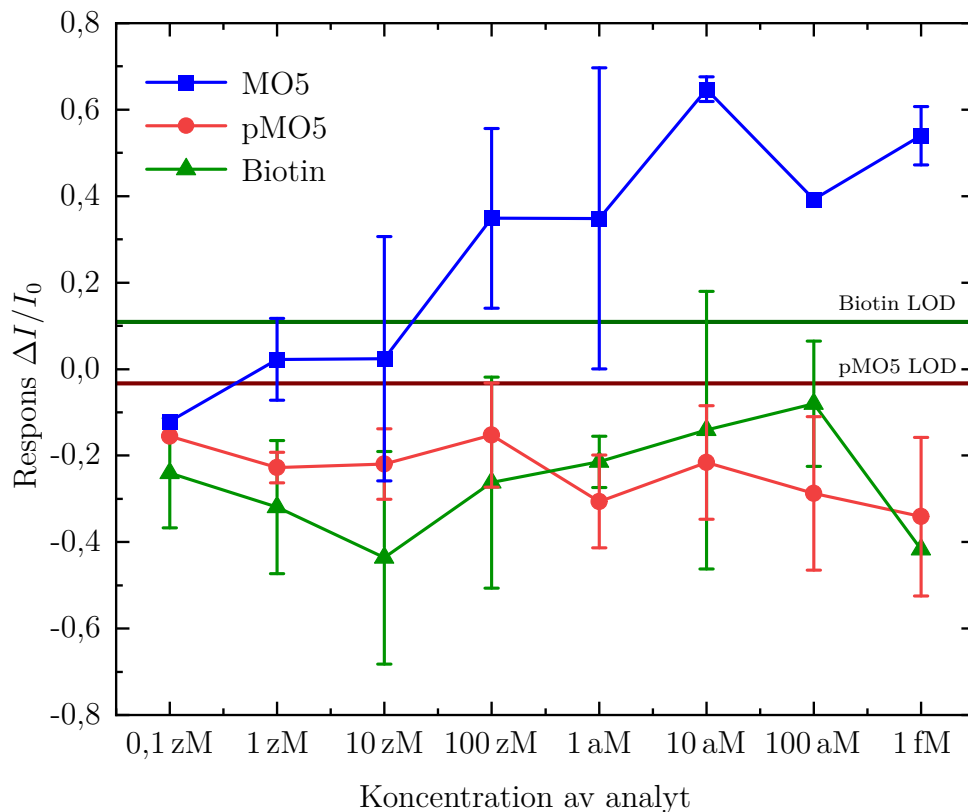
Det andra negativa kontrollexperimentet utfördes med en funktionaliserad gateelektrod där avidinet hade mättats med biotin. Som analyt användes den komplementära peptiden (Pep28) löst i buffert B1. Efter att en fullständig mätning med de relevanta koncentrationerna utförts, undersöks responsen som funktion av gatespänningen, Figur 4.3. Denna negativa kontrollmätning undersöker om den komplementära peptiden kan icke-specifikt binda sig till den funktionaliserade elektrodytan utan förekomsten av receptorpeptiden (MO5). Detta kontrollexperiment utfördes inte efter att provtillverkningen förnyades och streptavidin togs i bruk istället för avidin.



Figur 4.3: Responsen $\Delta I/I_0$ som funktion av V_G när spänningen varieras från $-0,1\text{ V}$ till $-0,7\text{ V}$, för sex st. olika koncentrationer av analyt. Strömmen genom transistoren när responsen är 0 är samma som baslinjeströmmen, det vill säga när 0 M av analyt har tillsatts. $V_{G,rmax}$ väljs godtyckligt i undertröskelområdet så att det motsvarar spänningen för de positiva kontrollmätningarnas högsta respons. I denna mätning var medelvärdet av tröskelspänningen $V_T = -0,41\text{ V}$ och $V_{G,rmax}$ valdes till $-0,30\text{ V}$. Under detta experiment degraderade transistoren mycket och $I_{D,max}$ med referenselektroden förändrades från $23\text{ }\mu\text{A}$ före experimentet till $7,6\text{ }\mu\text{A}$ efter.

4.2 Analys av resultat

Genom att analysera responsen för alla mätningar vid deras respektive spänningar $V_{G,rmax}$ som funktion av analytkoncentrationen fås biosensorns kalibreringskurva som innehåller information om de olika kontrollmätningarna samt sensorns egenskaper, se Figur 4.4.



Figur 4.4: Responsen $\Delta I/I_0$ som funktion av analytkoncentration. Den positiva kontrollmätningen (MO5) har en positiv respons, medan de negativa kontrollmätningarna (pMO5 och Biotin) har en negativ respons. Detektionsgränsen LOD har beräknats skilt för pMO5- och Biotinresponsen.

Det syns en tydlig skillnad i responsen från den positiva kontrollmätningen jämfört med de negativa kontrollmätningarna och bindningen av analyten till den icke-fosforylerade receptorpeptiden ökar strömmen som flyter genom transistor. Vid koncentrationerna 0,1 zM till 10 zM är responsen under detektionsgränsen erhållen från kontrollmätningen med biotin, det vill säga analyten kan icke-specifikt ha bundit sig till den funktionaliserade elektrodytan och således ha orsakat en ökning i strömmen. Vid 100 zM kan det med säkerhet konstateras att en biokemisk reaktion har tagit plats som stämmer överens med hypotesen; en neutralisering av positiv laddning på elektrodytan har förekommit på grund av att analyten och receptorpeptiden reagerat. Med hjälp av det elektriska dubbelskiktet

har denna elektrostatiska förändring ökat mängden laddningsbärare i den organiska halvledarens aktiva kanal och således flyter mera ström genom resistorn. Vid 10 aM verkar biolagret ha blivit mättad eftersom responsen inte ökar med högre koncentrationer.

Biosensorns *detektionsgräns* i form av den lägsta igenkännbara analytkoncentrationen fås från dessa experiment som 100 zM. En ökning av strömmen förekommer inte i de negativa kontrollmätningarna, därför kan det konstateras att biosensorn är *sektiv* och endast detekterar analyten. Genom att anpassa en rak linje till kalibreringskurvan mellan koncentrationerna 10 zM och 10 aM fås biosensorns *känslighet* som $\sim 0,19/\text{dec}$, det vill säga responsen ökar med 0,19 för varje storleksordning av analytkoncentration tills detektionselementet blir saturerat.

Antalet peptider som finns i 100 μL buffert B1 med analytkoncentrationen 100 zM kan beräknas med hjälp av Avogadros konstant:

$$\begin{aligned} n &= c \cdot N_A \cdot V \\ n &= 100 \text{ zM} \cdot 6,02214076 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}} \cdot 100 \mu\text{L} \\ n &= 6 \text{ st. peptider} \end{aligned}$$

Sannolikheten för att n st. detektionshändelser inträffar kan antas vara Poissonfördelad [19] vilket betyder att felet blir $\pm\sqrt{n}$. Vid koncentrationen 100 zM kan det då antas att (6 ± 2) st. detektionshändelser har inträffat.

I de positiva kontrollexperimenten har responsen $\Delta I_c/I_0$ varit störst i undertröskelområdet medan drainströmmen I_D vid maximala V_G knappt har förändrats alls, se Figur 4.1. Detta betyder att före en driftström kan flyta mellan source- och drainelektroden, det vill säga under tröskelspänningen V_T , påverkas den aktiva kanalen av analyten och antalet laddningsbärare genom den är högre när förekomsten av analyt finns. Över V_T är responsen betydligt lägre, vilket kan antyda att analytens effekt har förminskats i och med att en driftström kan flyta genom halvledaren. Det är viktigt att komma ihåg att drainströmmen i undertröskelområdet beskrivs av andra ekvationer än de som presenterades i avsnitt 2.1.3 och 2.2.2. Som följd av detta är det kanske inte idealt att undersöka responsen i detta område, även om det ger de bästa värden för biosensorns känslighet och detektionsgräns.

4.2.1 Problem och möjliga förbättringar

Utav närmare 20 st. påbörjade positiva kontrollmätningar har endast tre st. gett nöjaktiga resultat. *Repetierbarheten* hos experimentet har alltså varit väldigt dåligt, medan *reproducerbarheten* har varit bättre eftersom de mätningar som lyckats ge förväntade resultat har blivit utförda med olika konfigurationer av biosensorn och mätproceduren. Det största problemet med detta experiment är att det finns många olika faktorer som kan ändra på överföringsströmmen genom IMOFET:en. Den enda reaktion som borde förändra strömmen är bindningen av peptiderna, vilket enligt teorin ska öka på strömstyrkan $|I_D|$. Men eftersom det finns många olika delar i den kompletta biosensorn är det svårt att precisera vad som förändrar $|I_D|$. Om en mätning ger likadan form på responsen som i Figur 4.1 borde åtminstone peptiderna ha bundits till varandra och den största förändringen i $|I_D|$ från baslinjen syns tydligt som en topp vid undertröskelområdet. Samma form på responsen men förskjuten till ett lägre $|I_D|$ än baslinjen har dock också observerats. Ett sådant resultat tyder på att bindning av peptiderna sker men transistorerna degraderar under experimentet som påverkar överföringsströmmen mer än peptidreaktionen. I Figur 4.3 har responsen för vissa koncentrationer just denna form, vilket kan antyda att analyten har icke-specifikt bundit sig till biolagret och $|I_D|$ skulle ha ökat om inte degraderingen hade förskjutit baslinjen.

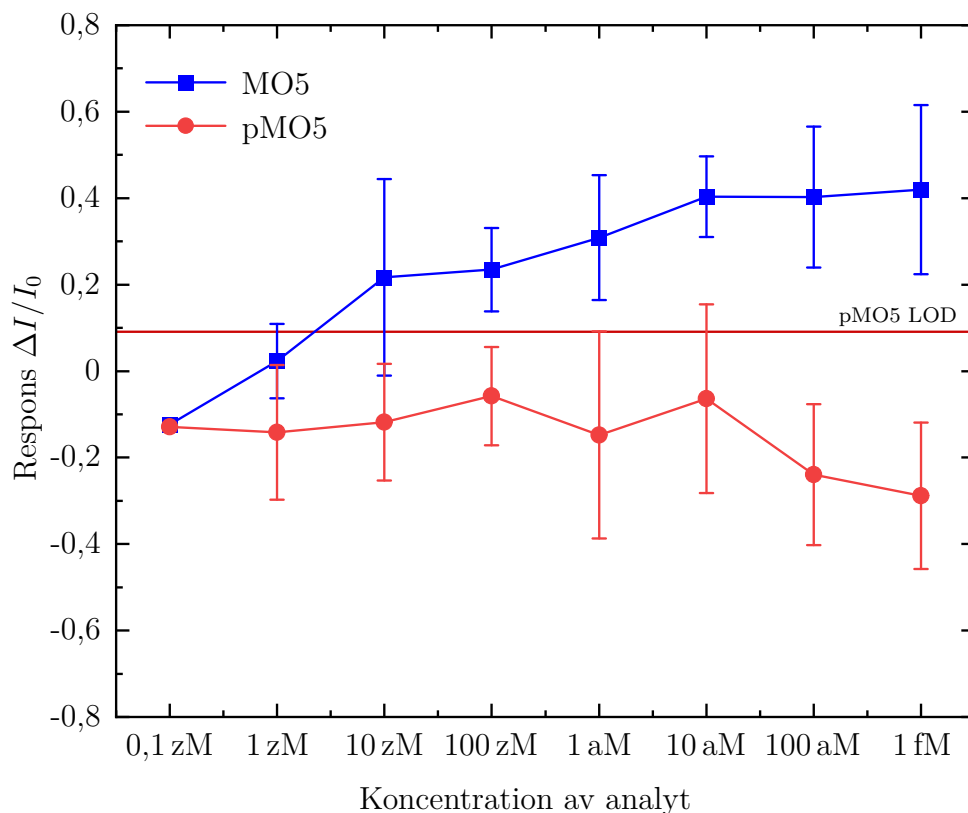
Biosensorns transduktor, det vill säga OFET:ens resistor, verkar ha orsakat de flesta problem eftersom det har varit svårt att få stabila överföringsströmmar under stabiliseringsperioden. Det leder till svårigheter att få en bra baslinje att jämföra strömmen I_D med. I dessa fall har ingen kontrollmätning påbörjats, utan en ny resistor har tillverkats och stabiliserats. Ett annat problem är degradering som pågår under mätningarna, vilket kan identifieras genom att jämföra överföringsströmmar med referenselektroden före och efter kontrollmätningen. Problem med resistorn uppstår oftast på grund av den organiska halvledaren. Elektrolyten samt de många olika ämnen som finns på den funktionaliserade gateelektroden kan orsaka dopning av halvledaren som i sin tur förändrar överföringsströmmarna. Faradaiska strömmar genom elektrolyten kan ha uppstått när $V_G = -0,7\text{ V}$ eftersom det är utanför vattnets elektrokemiska spänningsfönster. Detta kan i sin tur ha orsakat reaktioner som degraderade både den organiska halvledaren och biolagret.

Det krävs också bättre förståelse för hur den funktionaliserade elektrodytan förändras när en analyt fästs i den, samt hur det påverkar den aktiva kanalen mellan source- och drainelektroden. Eftersom det handlar om elektrisk detektion fås responsen som förändringen av drainströmmen I_D och således spelar valet av gatespänning V_G som responsen undersöks i stor roll. Biosensorns egenskaper, såsom detektionsgränsen och känsligheten, påverkas till stor grad av detta val. I denna avhandling presenterades responsen i Figur 4.4 vald vid en gatespänning under tröskelspänningen, $V_G < V_T$. Är undertröskelområdet en pålitlig region att undersöka responsen i, eller borde det finnas en fullständigt ledande kanal före analytens inverkan kan säkerställas? Hur den ström som flyter i undertröskelområdet påverkas av elektrolytens seriekapacitanser samt den biokemiska reaktionen vid biolagret borde undersökas närmare. Valet av spänningen V_G att undersöka responsen i kan påverka mycket de värden som fås för bland annat känsligheten och detektionsgränsen.

Under projektets tid har många förbättringar kring hela mätupställningen och provtillverkningen gjorts. En enhetlig modell av gateelektroden har tagits i bruk, det vill säga alla gateelektroder har samma form och storlek. En ozonrengörare används för att rengöra och aktivera guldytorna på elektroderna före kemisorptionen av SAM, som i sin tur nu görs helt i kväveatmosfär. Hela gateelektroden täcks med det självorganiserade monolagret, medan endast en del av den täcks med biolagret, vilket har förkortat den nödvändiga stabiliseringstiden i själva mätningarna. Streptavidin löst i fosfatbuffrad saltlösning (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS) används istället för avidin löst i B1. Detta borde ha minskat möjligheten för analyten att icke-specifikt binda sig till elektrodytan eftersom streptavidin har neutral laddning jämfört med avidinets positiva laddning [44]. Mätstationen har förnyats med bättre nålar, större arbetsyta och ett vakuumsystem som håller anordningen på plats. Den organiska halvledarens koncentration har ökat (4 mg/mL) och resistorn har således fått bättre karakteristik och livslängd. Resistorns degradering övervakas under kontrollmätningarna genom att mäta överföringsströmmar med referenselektroden medan den funktionaliserade elektroden inkuberas i analytlösning. En större vattenreservoar har anslutits till vattenbehållaren på resistorn för att automatiskt fylla på vatten varefter det avdunstar. Ett nytt mätinstrument (Keithley) har också tagits i bruk som har effektiviserat mätproceduren. Spänningsfönstret för

svepningen i överföringsläget har förändrats, 0,1 V till $-0,4$ V, och överskrider inte längre vattnets elektrokemiska spänningsfönster.

Av de resultat som presenterats hittills i denna avhandling är det endast två st. negativa kontrollmätningar med fosforylerade peptider som har utförts efter att förbättringar till mätuppställningen och provtillverkningsprotokollet gjorts. Flera kontrollmätningar, både negativa och positiva, med de nya tillverknings- och mätprotokollen har utförts av Axel Luukkonen, Amit Tewari och Amirmohammad Ghafarihashjin. Figur 4.5 innehåller resultat från både det som redan presenterats och från de nya mätningarna, förutom från experimenten med en biotinmättad funktionaliserad elektrodyta eftersom de inte har upprepats. Analysen av all respons har också utförts vid en gatespänning 0,1 mV över tröskelspänningen, vilket betyder att en driftström flyter genom halvledaren och de problem som kan uppstå med undertröskelområdet har eliminerats.



Figur 4.5: Responsen $\Delta I/I_0$ som funktion av analytkoncentration. Resultaten innehåller både den respons som redan presenterats samt från mätningar som utförts efter att hela mätsystemet förbättrats.

Kapitel 5

Sammanfattning och slutsatser

Den jonmodulerade organiska fälteffekttransistorns roll som ultrakänslig och markörfri biosensor har utforskats. En teori om hur ytförändringar leder till igenkänning av biokemiska reaktioner har föreslagits. En OFET med elektrolyt som dielektriskt ämne är känslig till förändringar på elektrodytorna på grund av den höga kapacitans som uppstår i samband med de elektriska dubbelskikt som bildas vid gateelektroden och halvledaren. För att utforska möjligheten för detektion av enskilda molekyler har peptider specifikt designade för detta projekt använts.

Biosensorns detektionselement består av komponenter fästa vid fälteffekttransistorns gateelektrod. För att detektera om peptiderna ger upphov till en bindningsreaktion byggs ett biolager upp på elektroden där en fysikalisk-kemisk förändring uppstår till följd av reaktionen. Själva fälteffekttransistorn fungerar som biosensorns transduktor eftersom de strömmar som flyter genom transistorns aktiva kanal påverkas av de förändringar och reaktioner som händer på gateelektroden. Peptidbindningsreaktionen åstadkommer en förändring av gateelektrodens elektrostatiska tillstånd som gör att mera ström flyter genom transistorn. Denna egenskap gör det enkelt att utföra kontrolexperiment med peptider som inte binder sig till varandra.

Experimentella resultat visar att detektion av ett fåtal analytpeptider har demonstrerats. Kontrolexperimenten visar också att det handlar om en detektionsgräns på (6 ± 2) st. peptider. Experimenten har dock präglats av många problem som har gjort det svårt att få tillförlitliga resultat. Flera experiment behövs för att eliminera systematiska mätfel

och få noggrannare resultat. Eftersom experimenten har utförts under en längre tid har vissa förbättringar av mätprotokoll och mätinstrument gjorts. Dessa har bidragit till att det nu är enklare att få tillförlitliga resultat samt att projektet har utvecklats vidare. En sammanfattning av dessa nya, bättre resultat har även presenterats i denna avhandling.

Den ultrakänsliga och markörfria biosensorn som utvecklats under arbetets gång spelar en central roll i ett antal nya forskningsprojekt. Denna avhandling fungerar som ett bevis på koncept för denna sorts anordning. Den funktionaliserade gateelektrodytan kan modifieras med andra biomolekyler än de specifika peptider som beskrivits i denna avhandling. Detta gör det möjligt att detektera andra biokemiska reaktioner, till exempel med antikroppar och antigener som är biomarkörer för olika sjukdomar. Nästa steg med de specifika peptider och den biosensor som använts i denna avhandling är att detektera den enzymatiska reaktion som fäster eller tar bort peptidmodifikationen.

Litteratur

- [1] A. D. McNaught och A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")*, 2. utg. (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997).
- [2] C. I. Justino, T. A. Rocha-Santos och A. C. Duarte, "Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29** (10), 1172–1183 (2010).
- [3] M. Velasco-Garcia, "Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects", i *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 20, 1 (Elsevier, 2009), s. 27–33.
- [4] F. Ma m. fl., "Fluorescent biosensors based on single-molecule counting", *Accounts of chemical research* **49** (9), 1722–1730 (2016).
- [5] National Cancer Institute, *NCI Dictionary of Cancer Terms*, (2011) <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms> (hämtad 2020-06-17).
- [6] B. Dorcelly m. fl., "Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications", *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* **10**, 345 (2017).
- [7] S. K. Metkar och K. Girigoswami, "Diagnostic biosensors in medicine—a review", *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **17**, 271–283 (2019).
- [8] L. Torsi m. fl., "Organic field-effect transistor sensors: a tutorial review", *Chemical Society Reviews* **42** (22), 8612–8628 (2013).
- [9] D. L. Nelson och M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (W. H. Freeman, 2008).
- [10] T. Alber, "Structure of the leucine zipper.", *Current opinion in genetics & development* **2** (2), 205–210 (1992).

- [11] R. A. Picca m. fl., "Ultimately Sensitive Organic Bioelectronic Transistor Sensors by Materials and Device Structures' Design", *Advanced Functional Materials*, 1904513 (2019).
- [12] R. B. Schasfoort m. fl., "Possibilities and limitations of direct detection of protein charges by means of an immunological field-effect transistor", *Analytica chimica acta* **238**, 323–329 (1990).
- [13] P. Romele m. fl., "Ion buffering and interface charge enable high performance electronics with organic electrochemical transistors", *Nature communications* **10** (1), 1–11 (2019).
- [14] S. Potelle, A. Klein och F. Foulquier, "Golgi post-translational modifications and associated diseases", *Journal of inherited metabolic disease* **38** (4), 741–751 (2015).
- [15] G. A. Khoury, R. C. Baliban och C. A. Floudas, "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database", *Scientific reports* **1**, 90 (2011).
- [16] G. M. Whitesides och B. Grzybowski, "Self-assembly at all scales", *Science* **295** (5564), 2418–2421 (2002).
- [17] D. K. Schwartz, "Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation", *Annual review of physical chemistry* **52** (1), 107–137 (2001).
- [18] J. C. Love m. fl., "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology", *Chemical reviews* **105** (4), 1103–1170 (2005).
- [19] E. Macchia m. fl., "Single-molecule detection with a millimetre-sized transistor", *Nature Communications* **9** (1), 3223 (2018).
- [20] D. Wang, V. Noël och B. Piro, "Electrolytic gated organic field-effect transistors for application in biosensors—A Review", *Electronics* **5** (1), 9 (2016).
- [21] E. Meijer m. fl., "Switch-on voltage in disordered organic field-effect transistors", *Applied Physics Letters* **80** (20), 3838–3840 (2002).
- [22] H. Klauk, "Organic thin-film transistors", *Chemical Society Reviews* **39** (7), 2643–2666 (2010).
- [23] A. Facchetti, "Semiconductors for organic transistors", *Materials Today* **10** (3), 28–37 (2007).

- [24] A. Tibaldi m. fl., "Electrolyte-gated organic field-effect transistors (EGOFETs) as complementary tools to electrochemistry for the study of surface processes", *Electrochemistry Communications* **98**, 43–46 (2019).
- [25] J. Rivnay m. fl., "Organic electrochemical transistors", *Nature Reviews Materials* **3** (2), 1–14 (2018).
- [26] T. Fujimoto och K. Awaga, "Electric-double-layer field-effect transistors with ionic liquids", *Physical Chemistry Chemical Physics* **15** (23), 8983–9006 (2013).
- [27] T. Cramer m. fl., "Water-gated organic field effect transistors—opportunities for biochemical sensing and extracellular signal transduction", *Journal of Materials Chemistry B* **1** (31), 3728–3741 (2013).
- [28] L. Kergoat m. fl., "A water-gate organic field-effect transistor", *Advanced Materials* **22** (23), 2565–2569 (2010).
- [29] O. Stern, "Zur theorie der elektrolytischen doppelschicht", *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* **30** (21-22), 508–516 (1924).
- [30] H. v. Helmholtz, "Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern, mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche (Schluss.)", *Annalen der Physik* **165** (7), 353–377 (1853).
- [31] H. Du m. fl., "Electric double-layer transistors: a review of recent progress", *Journal of Materials Science* **50** (17), 5641–5673 (2015).
- [32] G. Palazzo m. fl., "Detection Beyond Debye's Length with an Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor", *Advanced Materials* **27** (5), 911–916 (2015).
- [33] A. J. Bard m. fl., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2. utg. (John Wiley & Sons, New York, 2001).
- [34] L. Kergoat m. fl., "Advances in organic transistor-based biosensors: from organic electrochemical transistors to electrolyte-gated organic field-effect transistors", *Analytical and bioanalytical chemistry* **402** (5), 1813–1826 (2012).
- [35] S. Casalini m. fl., "Organic field-effect transistor for label-free dopamine sensing", *Organic Electronics* **14** (1), 156–163 (2013).
- [36] Á. Lavín m. fl., "On the determination of uncertainty and limit of detection in label-free biosensors", *Sensors* **18** (7), 2038 (2018).

- [37] A. Shrivastava, V. B. Gupta m. fl., "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods", *Chronicles of young scientists* **2** (1), 21 (2011).
- [38] B. Holzer m. fl., "Characterization of Covalently Bound Anti-Human Immunoglobulins on Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes", *Advanced Biosystems* **1** (11), 1700055 (2017).
- [39] N. Tong-Ochoa m. fl., "Homogeneous single-label tyrosine kinase activity assay for high throughput screening", *Analytica chimica acta* **897**, 96–101 (2015).
- [40] W. A. Hendrickson m. fl., "Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86** (7), 2190–2194 (1989).
- [41] C. Ching, K. Hidajat och M. Uddin, "Evaluation of equilibrium and kinetic parameters of smaller molecular size amino acids on KX zeolite crystals via liquid chromatographic techniques", *Separation Science and Technology* **24** (7-8), 581–597 (1989).
- [42] P. C. Weber m. fl., "Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin", *Science* **243** (4887), 85–88 (1989).
- [43] E. Macchia m. fl., "Organic electrochemical transistor immuno-sensor operating at the femto-molar limit of detection", i 2017 7th IEEE International Workshop on Advances in Sensors and Interfaces (IWASI) (IEEE, 2017), s. 68–72.
- [44] A. T. Marttila m. fl., "Engineering of chicken avidin: a progressive series of reduced charge mutants", *FEBS letters* **441** (2), 313–317 (1998).