

Розробка ферментного моно- та мультибіосенсора на основі напівпровідникового потенціометричного датчика зі світловою адресацією

С. В. Пацковський, Г. А. Жил'як¹, В. В. Волотовський, В. І. Стріха

Київський університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

У роботі досліджено потенціометричний сенсор зі світловою адресацією як основу для створення біосенсорів, зокрема, моно- та мультиферментних сенсорів. Отримані результати підтверджують перспективність даного напрямку в порівнянні з використанням традиційних іоночутливих польових транзисторів.

Вступ. Останнє десятиліття відзначено значним зростанням кількості наукових праць, присвячених розробці та промислового запровадженню напівпровідникових потенціометричних сенсорів. Проте значні зусилля, направлені на розробку іоночутливих польових транзисторів (ІЧПТ), які були відкриті Бергвельдом 20 років тому, не принесли відчутного комерційного успіху. На ринку існують, в основному, прості рН-чутливі системи на основі ІЧПТ, наприклад, такі, як SENTRON pH-meter (США). З іншого боку, дослідження та розробка потенціометричного сенсора зі світловою адресацією (ПССА) є багатообіцяючими в плані створення реальних біосенсорних систем [1].

ПССА — це, як правило, гетероструктура Si/SiO₂/Si₃N₄, яка освітлюється джерелом модульованого світла. Прикладаючи до гетероструктури напругу, отримуємо залежність фотострум—напруга. За допомогою останньої визначається зміна поверхневого потенціалу, який, в свою чергу, і є характеристикою проходження різноманітних біохімічних реакцій. На рис. 1 зображено типову залежність фотострум—напруга та її реакцію на зміну рН розчину.

Необхідно підкреслити, що представленому типу перетворювача (ПССА) по відношенню до

ІЧПТ притаманні наступні переваги: а) набагато простіший і сумісний зі стандартними методами мікроелектроніки процес виробництва, який не потребує додаткової розробки специфічної технології; б) вільна від будь-яких електричних контактів чутлива поверхня датчика, в результаті чого знімається значна і досить критична для ІЧПТ проблема капсуляції; в) ідеально плоска чутлива поверхня сенсора, що дає можливість застосовувати вкрай малі вимірювальні об'єми [2]; г) метод світлової адресації дозволяє на одному монокристалі створити незалежні інформаційні області, що значно спрощує створення мультибіосенсора.

Наведені особливості підтверджують перспективність та необхідність розробки даного типу потенціометричного перетворювача і його застосування для різних типів біосенсорів.

Експериментальна частина. Обов'язковою складовою частиною автоматизованої вимірювальної системи, що використовується для дослідження ПССА, є персональний комп'ютер, який забезпечує можливість оперативної обробки масивів даних у режимі реального часу та підтримання оптимальних умов проведення експерименту. Схематичне зображення установки та відповідної вимірювальної комірки подано на рис. 2. Необхідно відзначити, що вказана система дещо складніша, ніж та, що використовується для ІЧПТ, і потребує більшої кількості приладів та вищої кваліфікації персоналу.

Як джерело світла застосовується промисловий інфрачервоний світлодіод АЛ109, на який подається змінна напруга частотою 10 кГц синусоїдальної форми або сигнал типу меандр. Потенціостат забезпечує відгук сенсора до рівня, необхідного для ефективної роботи аналого-цифрового перетворювача (АЦП).

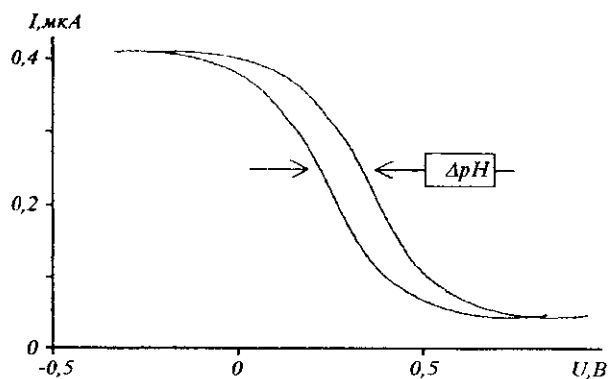


Рис. 1. Типова залежність фотострум—напруга в системі електрод—діелектрик—напівпровідник. Показано характерну реакцію на зміну рН розчину

рювань. Фазочутливий нановольтметр дає можливість реєструвати малі рівні сигналів (мкВ), оптимізує співвідношення сигнал—шум та підсилює відгук сенсора до рівня, необхідного для ефективної роботи аналого-цифрового перетворювача (АЦП).

Електронні карти цифро-аналогового перетворювача (ЦАП), АЦП та паралельного інтерфейсу для вводу—виводу даних у персональний комп'ютер були розроблені і виготовлені самостійно в нашій лабораторії. Відповідне програмне забезпечення написано на Паскаль 6.0 і включає в себе блок управління експериментом, блок прийому та обробки даних, блок відображення ходу експерименту та його параметрів на моніторі. Розроблена схема меню дозволяє оператору легко змінювати умови проходження досліджень для найефективнішого отримання результатів [3].

За допомогою системи, зображеної на рис. 2, було визначено рН-чутливість різних діелектричних шарів для підбору оптимальних умов вивчення процесу проходження ферментних реакцій. На рис.

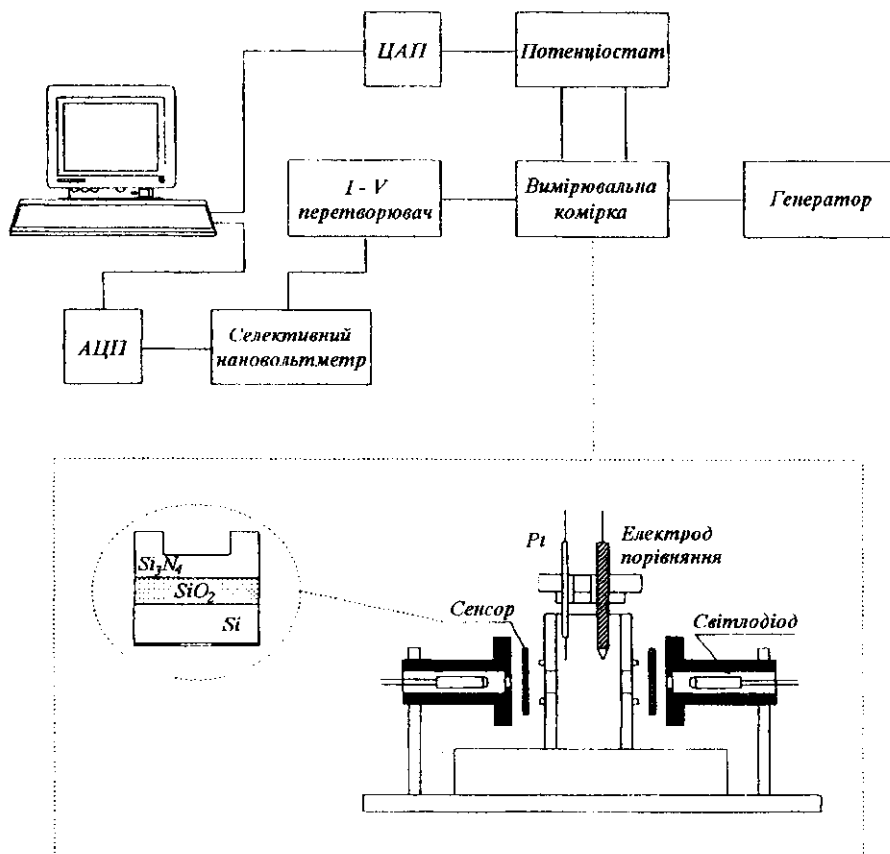


Рис. 2. Схематичне зображення потенціометричного сенсора зі світловою адресацією системи та дифе-

З показано залежність зміни поверхневого потенціалу від рН розчину для наступних матеріалів: Ta_2O_5 , Si_3N_4 , SiO_2 . Хоча у Ta_2O_5 рН-чутливість є найвищою, для подальших експериментів було відібрано Si_3N_4 по сукупності таких характеристик, як: рН-чутливість, пористість матеріалу, співвідношення сигнал—шум, надійність параметрів.

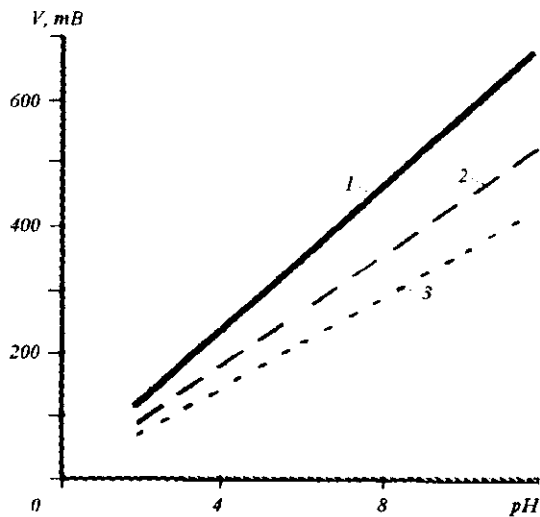


Рис. 3. Залежність поверхневого потенціалу різних діелектричних шарів від рН розчину: 1 — Ta_2O_5 (55 мВ/рН); 2 — Si_3N_4 (43 мВ/рН); 3 — SiO_2 (35 мВ/рН)

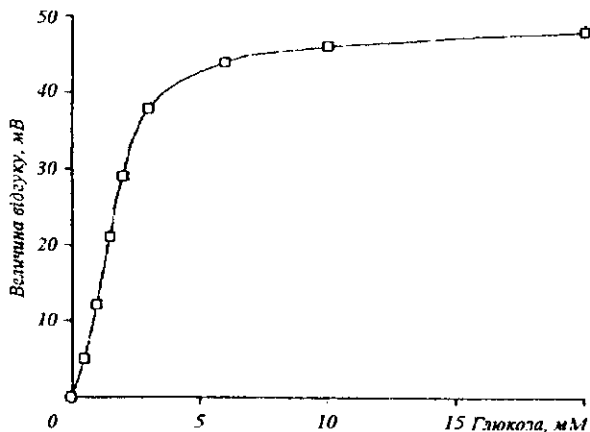
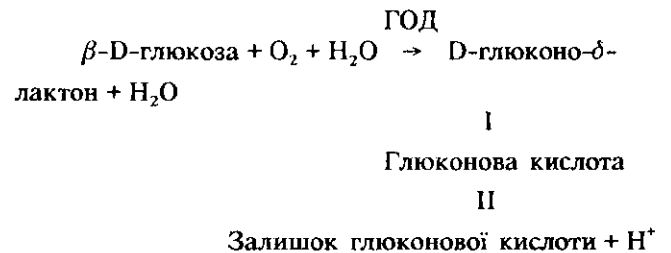


Рис. 4. Калібрувальна крива глюкозного потенціометричного сенсора зі світловою адресацією в стаціонарному режимі

Для розробки ферментного біосенсора використовували напівпровідниковий перетворювач на основі гетероструктури $p-Si/SiO_2(500 \text{ \AA})/Si_3N_4(1000 \text{ \AA})$. Як фермент було вибрано глюкозооксидазу (ГОД), яку за допомогою глутарового альдегіду включали до альбумінової мембрани, сформованої на поверхні діелектрика. Концентрація ферменту складала 100 мг/мл, сироваткового альбуміну біка — 100 мг/мл та глутарового альдегіду — 2,5 %. Гель-фермент-альбумін сформовано протягом 9—10 хв за температури 20 °С. В основі роботи біосенсора для визначення глюкози лежить реєстрація зміни рН розчину внаслідок зміни концентрації протонів у результаті дисоціації глюконової кислоти, яка утворюється в мембрані при окисленні глюкози за допомогою ГОД за схемою [4]:



На рис. 4 представлено калібрувальну криву глюкозного ПССА, визначену в стаціонарному режимі, тобто амплітуду відгуку вимірювали після встановлення в системі рівноваги. З цього рисунку видно, що лінійність калібрувальної кривої зберігається до 2—3 мМ глюкози, при вищих концентраціях спостерігається насичення. Отримані результати показали можливість створення моноферментного біосенсора на основі ПССЛ.

Проте найбільші перспективи у використанні ПССА, на думку авторів, пов'язані із застосуванням його для створення різноманітних типів мультисенсорів. Наступні дослідження були присвячені розробці сенсора для одночасного визначення декількох субстратів, у даному випадку — глюкози та сечовини. На рис. 5 наведено вимірювальну комірку з трьома інформаційними областями, які утворюються над відповідними світлодіодами. На двох з них формувалися ферментні мембрани — глюкозна та уреазна. Третю область використано як порівняльну, і на ній формувалася альбумінова мембрана, вільна від ферменту. Попередні експерименти показали, що в разі розміщення мембрани на відстані більше 1 мм досягається практична незалежність результатів. Формування уреазної мембрани є подібним до створення глюкозооксидазної, описаної вище. На рис. 6 показано залежності відгуку мультисенсора від часу.

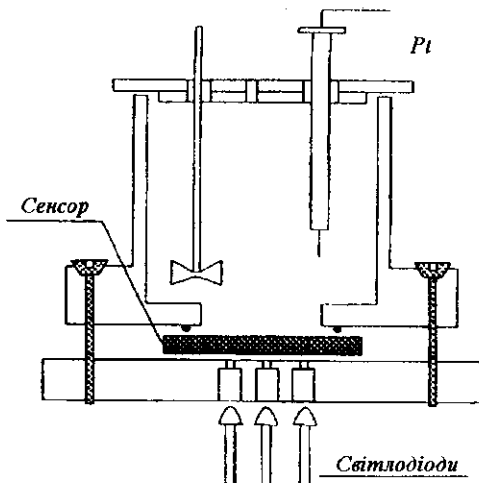


Рис. 5. Мультисенсорна вимірювальна комірка на три інформаційні області

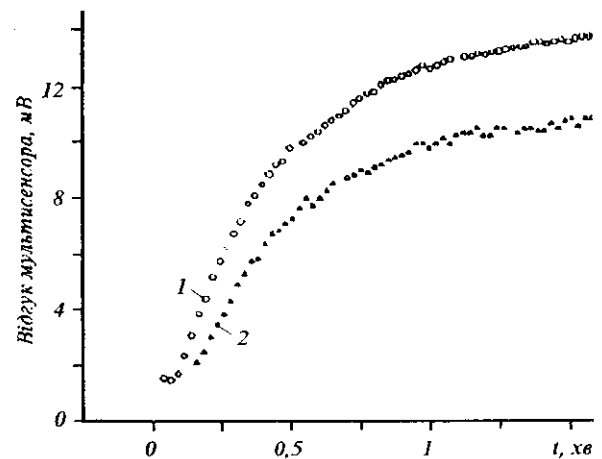


Рис. 6. Типовий вигляд відгуку мультисенсора на глюкозу та сечовину в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4: 1 — глюкоза (1 мМ); 2 — сечовина (1 мМ)

Насичення наступає через 1,5—2 хв після внесення субстрату в розчин. Амплітуди відгуків як для глюкози, так і для сечовини подібні до випадків при моноферментному аналізі, що ще раз підтверджує незалежність мультианалізу по різних реагентах.

Висновки. В роботі було розглянуто потенціометричний сенсор зі світловою адресацією і можливість розробки на його основі моно- та мультиферментного біосенсора. Отримані результати підтвердили ефективність та перспективність даного напрямку, особливо в плані розробки різних типів мультисенсорів. Поєднуючи ПССА з проведенням експерименту в мікрооб'ємі, цілком реально є створення імунних та імуноферментних сенсорів, які можуть мати широке застосування в медицині [5].

Частина представленої роботи фінансувалася міжнародним NATO Linkage грантом № ENVIR.LG 972305.

С. В. Пацковський, Г. А. Желяк, В. В. Волотовський, В. І. Стриха

Разработка ферментного моно- и мультибиосенсора на основе полупроводникового потенциометрического датчика со световой адресацией

Резюме

В работе исследован потенциометрический сенсор со световой адресацией как основа для создания биосенсоров, в частности, моно- и мультиферментных сенсоров. Полученные

результаты подтверждают перспективность данного направления по сравнению с использованием традиционных иончувствительных полевых транзисторов.

S. V. Patskovsky, G. A. Zhylyak, V. V. Volotovskiy, V. I. Strikha

Development of enzyme mono- and multi-biosensor based on a light addressable potentiometric sensor

Summary

In this work a light addressable potentiometric sensor (LAPS) has been considered as a basis for creation of biosensors. The opportunity of development of the mono- and multienzyme sensors with the help of LAPS has been shown. The results received confirm prospect of this direction in comparison with use of traditional ion-sensitive field effect transistors.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hafeman D. G., Parce J. W., McConnell H. M. Light addressable potentiometric sensor for biochemical systems // Science.—1988.—240.—P. 1182.
2. Bousse L., Owicki J. C., Parce J. W. Biosensors with micro-volume reaction chambers // Chem. Sensors Technol.—1992.—4.—P. 145—166.
3. Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Patskovsky S. V., Arkhipova V. N., Soldatkin A. P., Strikha V. I. Thin-film conductometric transducer for enzyme biosensors // Electrochemistry.—1994.—30, N 8.—P. 982—987 (Rus).
4. Пацковський С. В., Стриха В. І. Мультибиосенсор со световой адресацией // Респ. науч.-практ. конф. «Наукоемкие технологии двойного назначения» (Киев, 19—21 апреля, 1994).—Киев: КВИУЗ, 1994.—164 с.
5. Adami M., Sartore M., Nicolini C. PAB: a newly designed potentiometric alternating biosensor system // Biosensors and Bioelectronics.—1988.—10.—P. 155—167.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 09.11.98