

## ЕЛЕКТРОНІКА

УДК 620.3

**Кутова О.Ю.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний університет імені Ігоря Сікорського»

**Душейко М.Г.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний університет імені Ігоря Сікорського»

**Шкель К.О.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний університет імені Ігоря Сікорського»

**Тимофєєв В.І.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний університет імені Ігоря Сікорського»

### **ШВИДКИЙ АНАЛІЗ СРБ З ВИКОРИСТАННЯМ БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ІСПТ**

*У роботі описано розробку нової біосенсорної системи, побудованої на основі іонселективного польового транзистора для детектування білка гострої фази запальних процесів – С-реактивного білка (СРБ). Описано принцип його роботи і представлено результати експериментів з використанням розведеного стандартного набору проб. Установлено робочий об'єм – 20 мкл і діапазон робочих концентрацій СРБ в розчині для запропонованого сенсора – 0,2 мг/л–25 мг/л. Для запропонованого сенсора чутливість становить 91,25 мВ/(мг/л), а час вимірювання – близько 1 хв. Окрім експериментальних даних, також запропоновано подальші етапи вивчення й удосконалення ІСПТ біосенсора.*

**Ключові слова:** біосенсор, С-реактивний білок, іонселективний польовий транзистор, аналіз, гостра, фаза.

**Постановка проблеми.** Польові транзистори мають широкий спектр застосування. Зростає зацікавленість до виготовлення сенсорів на основі МДН-транзисторів, завдяки їх вагомим перевагам, а саме: високому співвідношенню сигнал-шум, швидким процесам вимірювання, а також компактності й портативності. Сьогодні існує низка біосенсорів на основі МДН-транзисторів для дослідження взаємодії біомолекул, що є ключовою особливістю біологічних реакцій у системах *in vitro* та *in vivo*. А використання іон селективного польового транзистора (далі – ІСПТ) для таких застосувань набирає популярності. Тому виникає необхідність створення біосенсора С-реактивного білка (далі – СРБ) саме з використанням ІСПТ.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** СРБ є багатофункціональним біомаркером гострої фази в разі запалень і захисту від чужорідних

агентів, некрозів та аутоімунних процесів [1–3]. Визначення концентрацій СРБ в біологічних рідинах використовується для прогнозування ступеня ризику розвитку гострого інфаркту міокарда, мозкового інсульту, раптової смерті людей, які не страждають на серцево-судинні захворювання [2–7]. У зв'язку з цим спостереження за вмістом СРБ в сироватці крові або інших біологічних рідинах людини має велике значення для діагностики та прогнозу розвитку запального процесу. Сьогодні більшість вимірювань СРБ виконуються в централізованих лабораторіях, що призводить до значних затримок у часі визначення результату. Саме тому є необхідність розробки мініатюрної сенсорної системи, яка має переваги в часі та зручності.

**Постановка завдання.** Метою роботи є розробка біосенсорної системи на основі ІСПТ для

швидкого експрес-аналізу вмісту СРБ у фізіологічних розчинах.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Усі МДН-транзистори мають три напівпровідникові ділянки: витік, стік і затвор. Між стоком і витоком немає фізичного контакту, але струм між ними проходить по провідному каналу. Напруга між затвором і витоком вмикає або вимикає транзистор. Струм стоку транзистора визначається потоком носіїв, а саме для каналу n-типу це електрони, а для р-типу – дірки. Для МДН-транзисторів р-типу негативна напруга, прикладена до затвору, відкриває його й спричиняє рух дірок через канал від витоку до стоку. Проте в разі прикладання негативної напруги до МДН-транзистора n-типу вона закриває його. Для МДН транзисторів n-типу спостерігається протилежна ситуація, позитивна напруга відкриває канал, а негативна – закриває. Розподіл електричного поля відбувається вертикально вниз і залежить від прикладеної напруги. Коли прикладена напруга досягає деякого порогового значення (напруги насичення  $V_{\text{пор}}$ ), струм починає протікати від витоку до стоку. Напруга насичення визначається як деяке критичне значення напруги між затвором і витоком ( $V_{\text{зв}}$ ), при якій накопичується достатня кількість рухомих електронів чи дірок, що породжують провідний канал. Коли  $V_{\text{зв}}$  близька до  $V_{\text{пор}}$  чи менша МДН р-типу відкривається, а для МДН n-типу ситуація протилежна,  $V_{\text{зв}}$  повинна бути більша за  $V_{\text{пор}}$ , щоб утворився канал між витоком і стоком. Рівняння, яке наведено нижче, широко використовується для теоретичного пояснення роботи МДН-транзистора з метою з'ясування причин змін електричного поля в режимі насичення чи в активному режимі.

$$I_c = \frac{1}{2} \mu_p C^* \left( \frac{W}{L} \right) (V_{\text{зв}} - V_{\text{пор}})^2, \quad (1)$$

де  $\mu_p$  – мобільність дірок,  $C^*$  – ємність підзатворного діелектрика,  $L$  – довжина каналу,  $W$  – ширина каналу,  $V_{\text{пор}}$  – напруга насичення та прикладена напруга зміщення  $V_{\text{зв}}$ .

Щільність поверхневих зарядів аналіту впливає на прикладену напругу  $V_{\text{зв}}$ . Щоб детектувати біологічні молекули, використовуючи МДН-транзистори, досліджуваний зразок речовин повинен бути прив'язаний до активного чутливого шару.

Тоді рівняння (1) зміниться:

$$I_c = \frac{1}{2} \mu_p C^* \left( \frac{W}{L} \right) (V_{\text{зв}} - V_{\text{пор}} + V_{\text{біо}})^2. \quad (2)$$

Додатковий доданок  $V_{\text{біо}}$  істотно впливає на струм  $I_c$ . Відповідно до описаного вище прин-

ципу, струм стоку збільшується, коли негативно заряджені молекули прив'язуються до поверхні підзатворного діелектрика МДН-транзистора.

Електричне поле, викликане змінами щільності поверхневих зарядів аналіту поблизу затвора, рівне напрузі затвору.

Серед усіх наявних сьогодні типів МДН-транзисторів метал-оксид-напівпровідник польові транзистори є найпоширенішими. В основі його роботи лежить використання електричного поля, яке модулює за формою та розміром канал між стоком і витоком, що називається модуляцією довжини та форми каналу. У відповідь на досліджуваний аналіт затвор контролює потік дірок через канал, сформований між стоком і витоком, так змінюючи струм  $I_c$ . Такий тип біосенсора використовують для аналізу ДНК-білкової взаємодії [8].

Використання ІСПТ як сенсора являє собою перспективний інструмент для біологічного застосування. Структурно ІСПТ та МДН-транзистори подібні. Загалом ІСПТ немає металевого затвора, оскільки він замінений на іончутливу мембрану, розчин електроліту й електрод порівняння. Значення струму в ІСПТ цілком залежить від щільності заряду молекул аналіту на поверхні затвору.

Незважаючи на численні переваги у використанні МДН-біосенсорів, вони все ще мають проблеми, пов'язані з дебаївською довжиною екранування. Інколи обмеження щодо дебаївської довжини вважаються основними для пристроїв на основі МДН-транзисторів. В останні три десятиліття прикладено значні зусилля для покращення структури МДН-транзисторів з кращою продуктивністю і зняття фізичних обмежень МДН-технології.

Для розпізнавання біомолекул (рецепторів) найчастіше використовують антитіла як захоплюючий елемент для виявлення, ізоляції та кількісного аналізу досліджуваного розчину, оскільки вони можуть специфічно зв'язуватися з антигеном. Під час утворення комплексу «антиген-антитіло» відбуваються істотні зміни в потенціалі на затворі через зміну поверхневого заряду.

У роботі досліджується сенсор на основі ІСПТ для визначення концентрацій СРБ в біологічних рідинах.

Для проведення експерименту використовували мультиметр Keithley 2410, програмне забезпечення Origin, фосфатний буферний розчин (pH = 7,4), антитіла Mix-n-Stain™ Biotin reagent MSDS available (Biotin Antibody Labeling Kit), стрептавін-HRP, біотин, TritonX100 концен-

трацією 1% і 2%, моноклональні антитіла СРБ, С-реактивний білок (СРБ) від MyBioSource.com чистота > 95% (SDS-PAGE (нередукований): одночастотний 21kDa). Використовували розведений стандартний тестовий набір з концентраціями: 0 мг/л, 0,25 мг/л, 1 мг/л, 2,5 мг/л, 10 мг/л, 25 мг/л. Для перевірки виконаних розведень використовували NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers.

ІСПТ біосенсор є польовим транзистором р-каналу типу метал-діелектрик-напівпровідник, який виготовлено на кремнієвій пластині (Si-n-тип, напівпровідник) легованій фосфором (n-тип), з опором 4,5 Ом/□, орієнтацією (111), товщиною 450 мкм. Як підзатворний діелектрик вибрано SiO<sub>2</sub>-CeO<sub>2</sub>, товщиною 60 нм. Діоксид кремнію одержано шляхом термічного окислення, а тонкий шар оксиду церію – методом «окислення металевого дзеркала». Омичні контакти з р-Si зроблені з алюмінію, ізоляція робочої ділянки – клей ВК-9.

Вибір робочої напруги на електроді порівняння здійснювався з робочою характеристикою польового транзистора, що знімалася при U<sub>св</sub> = 2,5 В (рис. 1). При U<sub>зв</sub> = -5В проводили вимірювання розчинів з різними концентраціями СРБ. На першому етапі на очищену поверхню біосенсора наносили стрептавідин на 12 год. (знижує неспецифічне зв'язування та покращує зв'язування антитіла з поверхнею сенсора). Після змивання фосфатним буфером незв'язаних залишків реактиву наносили кон'югатантитіл до СРБ, мічений з пероксидазою хрому й біотином (20 мкл), і залишали на 15 хв. І лише після повторного змивання буферним розчином незв'язаних залишків комплексу та вимірів для буферного розчину проводили вимірювання для різної концентрації антигену (СРБ) в діапазоні 0–25 мг/л. Між вимірюваннями поверхню біосенсора промивали буферним розчином з 1%-TRITONX100. Для надійності утворення комплексу АТ-АГ після нанесення проби перед вимірюванням очікували близько 5 хв. Вимірювання зразків проводили в бік збільшення концентрацій. Кожне вимірювання зразка СРБ проводили щонайменше три рази й розраховували середнє значення.

#### Результати та обговорення

З робочою характеристикою ІСПТ (рис. 1), знятої при фіксованій напрузі між стоком і витоком U<sub>св</sub> = 2,5, вибирали робочу напругу на затворі U<sub>зв</sub> = -5В, при якій знімали вихідні характеристики ІСПТ при різних концентраціях СРБ в стандартних розчинах (рис. 2).

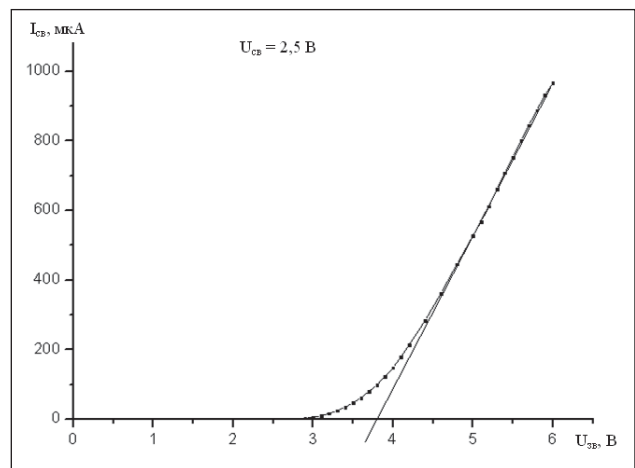


Рис. 1. Робоча характеристика біосенсора при U<sub>св</sub> = 2,5В

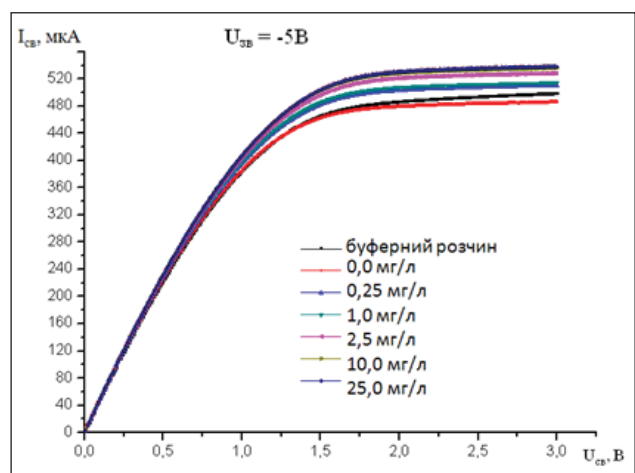


Рис. 2. ВАХ ІСПТ при різних концентраціях СРБ стандартного набору при U<sub>зв</sub> = -5В

Похибка проведених розведень стандартного набору концентрацій перевірялась за допомогою NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometersta, становила 1–2%. Час проведення одного вимірювання становить 47+/-2 с.

З отриманого сімейства ВАХ при U<sub>св</sub> = 2,5 і напруги на затворі U<sub>зв</sub> = -5В визначали чутливість сенсора як кут нахилу характеристики ΔU<sub>зв</sub> = f(C), використовуючи рис. 1, 2 (рис. 3). Апроксимуючи отриману залежність ΔU<sub>зв</sub> = 0,12–0,11\*exp(-0,86\*C) і значення чутливості:

$$\alpha = \frac{d\Delta U_z}{dC} = 91,25 \text{ мВ}/(\text{мг/л}).$$

У разі зміни концентрації антигену зміна значення струму для транзистора має лінійну кореляцію й описується логарифмом концентрації в діапазоні від 0,25 мг/л до 25 мг/л. Показник R<sup>2</sup>-лінійної залежності значення струму для вимірюваного діапазону близький до одиниці (R<sup>2</sup> = 0,98), означає, що розроблений біосенсор має високий потенціал для практичного застосування у визначенні СРБ в розчинах (рис. 4).

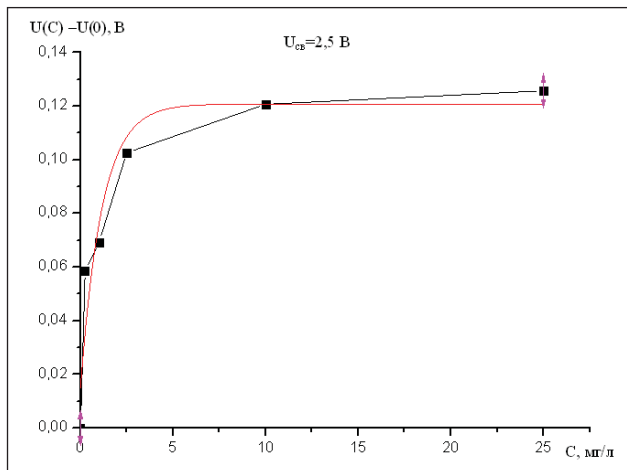


Рис. 3. Залежність зміни напруги на затворі  $\Delta U_3$  від концентрації СРБ

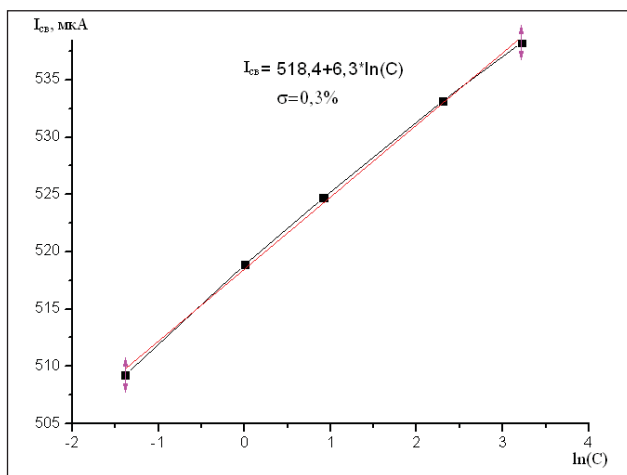


Рис. 4. Графік лінійної залежності струму від логарифму концентрації

У процесі експерименту зафіксовано час для проведення одного вимірювання є меншим, ніж 1 хв. Також для забезпечення точності вимірювань необхідно враховувати температуру та освітлення. Так як біологічним об'єктом роботи є білок, то варто приділити необхідну увагу температурі процесу. Як відомо, при високих температурах реакція відбуваються швидше і краще, а при низьких температурах збільшується час проходження реакції. Варто зазначити, що рекомендовано не перевищувати температуру більше за  $50^{\circ}\text{C}$ , щоб уникнути денатурації білка й утрати структури СРБ, що визначається, у розчині. Установлено, що найбільш оптимальною робочою температурою є  $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Висновки.** У результаті вперше розроблено модифікацію ІСПТ, яка дає змогу визначати вміст СРБ в розчинах у встановленому діапазоні детектування. Запропонований біосенсор відрізняється простотою конструкції, дешевизною та широкою доступністю матеріалів (Si, SiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>), а швидкість вимірювання становить до 1 хв. Для запропонованого сенсора чутливість становить  $\alpha = 91,25$  мВ/(мг/л). Максимальна концентрація, що була виміряна, – 25 мг/л. Вимірювання більших значень не проводилися, так як вони не мають клінічного значення. Запропонований датчик є перспективним і достатньо чутливим для виявлення СРБ у крові людини для використання з метою діагностики запальних процесів. Отже, отримане значення чутливості підтверджує можливість використання цього біосенсора, а дослідження його порогу буде проводитися в наступних дослідженнях.

#### Список літератури:

1. Hom N.M., Promptmas C and Kesara W.-A. Detection of DNA Hybridization Using Protein A Modified Ion Sensitive Field Effect Transistor, *Analytical Letters* 48 (7). 2015. P. 1128–1138.
2. Dong Z., Wejinyaa U.C., Elhajj I.H. Fabrication and testing of ISFET based pH sensors for microliter target solutions, *Sensors and Actuators A: Physical*. 2013, 194. P. 181–187.
3. Poghosian A., Ingebrandt S., Offenhäusser A., Schöning M.J. Field-effect devices for detecting cellular signals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009, 20 (1). P. 41–48.
4. Clark L.C.Jr. and Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 102, 1962. P. 29–45. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
5. Kutova O., Dusheiko M., Obukhova T., Maksimchuk N., Borodinova T., Tymofeev V. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on MOSFET with active layer in substrate area, *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017 – T. 14. № 4. P. 5–12.
6. Bergveld P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements, *IEEE Trans. Biomed Eng.* 17(1), 1970. P. 70–71.
7. Steve. Caras, Jiri. Janata, Field effect transistor sensitive to penicillin, *Anal Chem*, 1980, 52 (12). P. 1935–1937.
8. Han S.H., Kim S.K., Park K., Yi S.Y., Park H., Lyu H., Kim M. and Chung B.H. Detection of mutant p53 using field-effect transistor biosensor, *Anal. Chim. Acta* 2010, 665 (1). P. 79–83.

### **БЫСТРЫЙ АНАЛИЗ СРБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА НА БАЗЕ ИСПТ**

*В работе описано разработку новой биосенсорной системы, построенной на базе ионселективного полевого транзистора для детектирования белка острой фазы воспалительных процессов – С-реактивного белка (СРБ). Представлены принцип его работы и результаты экспериментов, используя разбавленный стандартный набор проб. Установлено рабочий объем – 20 мкл и диапазон рабочих концентраций СРБ в растворе для предложенного сенсора – 0,2 мг/л–25 мг/л. Для предложенного сенсора чувствительность составляет 91,25 мВ/(мг/л), а время непосредственного измерения – около 1 мин. Также предложены дальнейшие этапы изучения и усовершенствования ИСПТ биосенсора для СРБ.*

**Ключевые слова:** биосенсор, С-реактивный белок, ионселективный полевой транзистор, анализ, острая, фаза.

### **RAPID CRP ANALYSIS USING ISFET BIOSENSOR**

*In this work new biosensor system based on ion selectivity field effect transistor is proposed. This sensor is used to detect the acute phase protein – C-reactive protein (CRP). There is the working principle and the results of experiments using a diluted standard samples kit. A working volume is only 20  $\mu$ l and a range of working concentrations of CRB in the solution for the proposed sensor is 0.2 mg/L–25 mg/L have been established. For the proposed sensor, the sensitivity is 91.25 mV/(mg/L), and the measurement time is just about 1 min. In addition to experimental data, further stages of research and ISFET biosensor's improvement are proposed.*

**Key worlds:** biosensor, C-reactive protein, ion sensitivity field effect transistor, analysis, acute, phase.