

Биосенсоры на основе ионоселективных полевых транзисторов: теория, технология, практика

С. В. Дзядевич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Рассматриваются основные теоретические принципы, лежащие в основе работы ионоселективных полевых транзисторов и их применения в биоаналитической практике. Приведены некоторые особенности наиболее продвинутых микротехнологий для их изготовления, схемы измерений с сопутствующим аппаратным обеспечением. Детально описаны достижения в области разработки ферментных биосенсоров на основе ионоселективных полевых транзисторов и оценены перспективы их использования.

Введение. Разработка биосенсоров — аналитических устройств нового поколения — является на сегодня одним из наиболее перспективных направлений исследований в области аналитической биотехнологии. По типу преобразования сигнала они разделяются на оптические, акустические и электрохимические. Последние, в свою очередь, подразделяются на амперометрические, кондуктометрические и потенциометрические. Биосенсоры на основе ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ), которые раньше входили в состав потенциометрических преобразователей, в последнем техническом рапорте IUPAC, касающемся электрохимических биосенсоров, выделены в отдельный (четвертый) класс электрохимических датчиков [1]. Это, прежде всего, свидетельствует о безусловной важности данного класса биосенсоров.

Первый ИСПТ (ISFET в английском варианте) кратко описан Бергвельдом в работе [2], где его предполагали использовать для электрофизиологических измерений ионного состава в окружении нервных тканей. Эта идея осуществлена и подробно описана в 1972 г. в сообщении [3], и сегодня большинство авторов воспринимает и цитирует ее как пионерскую публикацию в этой области. Первый ИСПТ состоял из МДП (металл/диэлектрик/полупроводник) транзистора, затвор которого был заменен тестируемым раствором. Примерно в

это же время Мацуо и Вайс применили нитрид кремния в качестве чувствительного подзатворного слоя, тем самым существенно улучшив полученный датчик [4]. Именно эти первые работы и положили начало интенсивным исследованиям в области разработки ИСПТ.

В целом за 30-летний период исследований в области разработки ионоселективных полевых транзисторов опубликовано более 700 статей, касающихся различных аспектов их создания [5]. Такое внимание данным сенсорам можно объяснить, прежде всего, тем, что для изготовления полевых транзисторов всегда используется полупроводниковая технология, обеспечившая в свое время громадный прогресс в микроэлектронике. Последние достижения в изготовлении планарных и непланарных структур микрометровых и субмикрометровых размеров на базе монокристаллического кремния, глубокие знания о механических и электрических свойствах последнего позволили придать импульс этому новому направлению аналитической биотехнологии [6]. История использования кремния при создании широкого спектра сенсоров хорошо описана в обзоре [7].

Кроме того, групповая технология интегральных схем (ИС) является наилучшим средством снижения себестоимости отдельного прибора, налаживания их массового производства. Она обеспечивает возможность интеграции и совмещения на одном кристалле нетрадиционных вычислительных

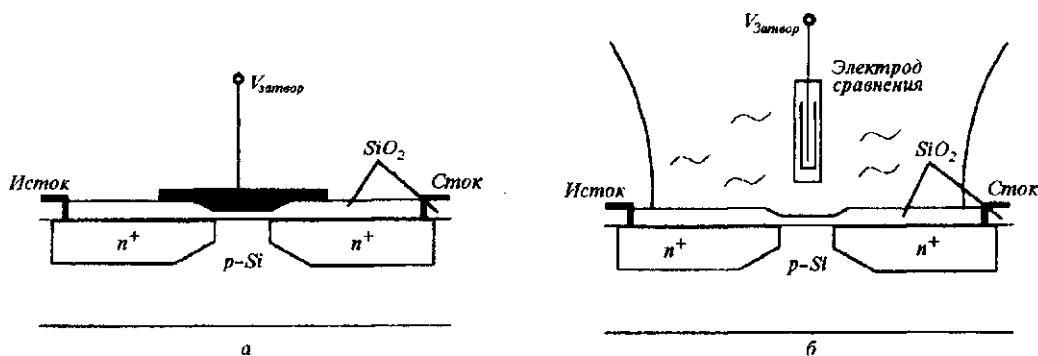


Рис. 1. Схематический вид МДП ПТ (а) и ИСПТ (б)

и детектирующих устройств с буферной электронной схемой обработки и долговременного хранения информации. Поэтому разработка и промышленный выпуск чувствительных, специфичных, миниатюрных и дешевых биосенсоров, несомненно, приведут к глобальным изменениям в характере и методах сбора информации о состоянии объектов и сред в быту, медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве, мониторинге окружающей среды и т. д.

В данном обзоре рассматриваются основные теоретические принципы, лежащие в основе применения ИСПТ в биоаналитической практике, особенности микротехнологий для их изготовления, схемы измерений, а также примеры различных ферментных биосенсоров на основе ИСПТ.

Теоретические основы работы ИСПТ. Ионоселективный полевой транзистор есть не что иное, как классический МДП полевой транзистор с затвором в форме электрода сравнения, который отделен от самой структуры и соединяется с затворной областью через водный раствор (рис. 1). В кремниевой подложке с дырочной проводимостью (p-Si) созданы области с электронной проводимостью (n⁺-области, а именно — n⁺-исток и n⁺-сток). Над каналом между ними расположен управляющий электрод-затвор, отделенный от подложки слоем подзатворного диэлектрика.

Описание механизма работы ИСПТ можно начать с теоретического описания работы МДП ПТ [8]. Схема на рис. 2, а — это зонная диаграмма структуры металл/диэлектрик/полупроводник при отсутствии напряжения на затворе. Уровень Ферми одинаков как для металла, так и для полупроводника, а проводимость приповерхностной области полупроводника не отличается от объемной проводимости. Схема на рис. 2, б — та же диаграмма при V_з > 0 (V_{си} = 0). Уровень Ферми в металле и полупроводнике начинает различаться из-за прикладываемого напряжения. Изгиб зон приводит сначала к обеднению приповерхностной области дырками (положительными зарядами), а при V_з > V_{порог} (рис.

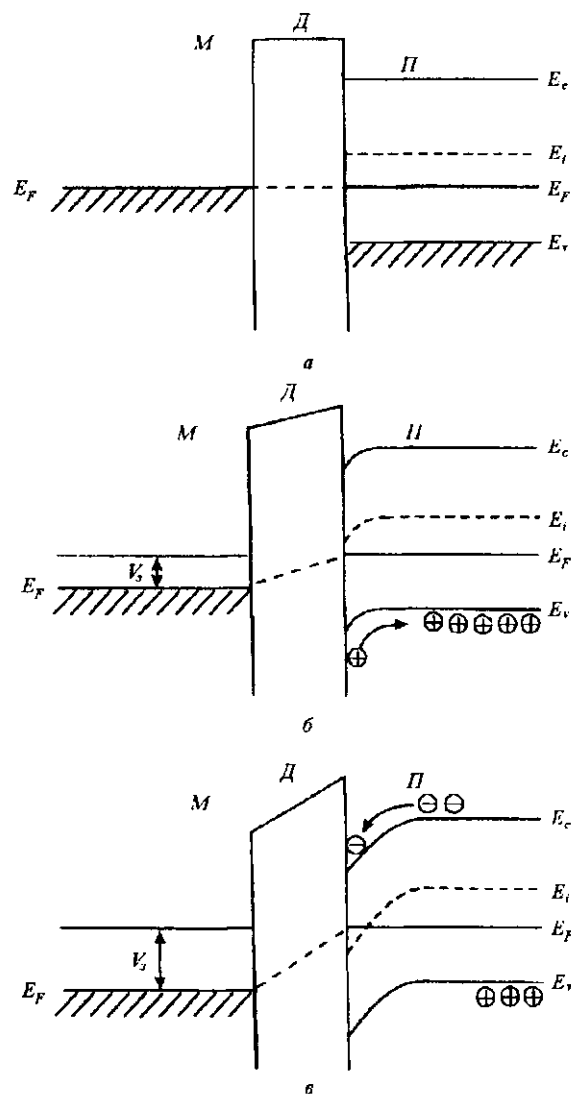


Рис. 2. Зонные диаграммы структуры металл(М)/диэлектрик(Д)/полупроводник(П) при отсутствии напряжения на затворе (а), при V_з > 0 (б) и V_з > V_{порог} (в): E_F — уровень Ферми; E_i — собственный уровень Ферми в полупроводнике; E_c — дно зоны проводимости; E_v — край валентной зоны

2, а) у поверхности полупроводника возникает область, обогащенная электронами — инверсионный слой, проводимость которого сильно зависит от напряжения на затворе.

Общее уравнение для описания тока стока для МДП ПТ в режиме ненасыщения имеет следующий вид [5]:

$$I_d = C_{\text{ок}} \mu \frac{W}{L} \left[(V_{\text{gs}} - V_t) V_{\text{ds}} - \frac{1}{2} V_{\text{ds}}^2 \right],$$

где $C_{\text{ок}}$ — удельная емкость оксида; W и L — ширина и длина канала соответственно; μ — подвижность электронов в канале. Остальные параметры представлены на рис. 3.

Если параметр геометрической чувствительности $\beta = \mu C_{\text{ок}} W/L$, а прикладываемое напряжение стока—истока V_{ds} и пороговое напряжение V_t являются постоянными величинами, то ток стока I_d есть уникальная функция входного напряжения V_{gs} . Фактически, для МДП ПТ параметр β — всегда постоянная величина, зависящая от дизайна транзистора; V_{ds} — тоже постоянная величина, которая задается искусственно прикладыванием определенного напряжения между стоком и истоком. Пороговое напряжение V_t зависит от технологического процесса изготовления транзистора и также в каждом конкретном случае является постоянной величиной. Таким образом, только V_{gs} является входной переменной величиной.

Для ИСПТ же появляется возможность химически модифицировать пороговое напряжение V_t через поверхностный потенциал на границе раздела электролит/оксид. В такой ситуации обычно электрод сравнения соединяется с истоком ($V_{\text{gs}} = 0$) и входной переменной величиной становится V_t . Для придания ИСПТ химической чувствительности к определенному веществу хемоселективную мембрану присоединяют последовательно к подзатворному диэлектрику.

Различают четыре основных источника возникновения разности потенциалов на границе раздела твердая фаза/электролит: 1) перенос заряда через границу раздела; 2) различие в специфической адсорбции ионов противоположного знака на твердой поверхности; 3) адсорбция или ориентация молекул, обладающих собственным дипольным моментом; 4) поляризация атомов и молекул в неоднородном силовом поле вблизи границы раздела. Устанавливающийся в результате химического взаимодействия потенциал действует последовательно с любым внешним смещением, приложенным к затвору, и поэтому регистрируется аналогично изменению напряжения на затворе МДП ПТ. Существуют различные твердофазные материалы типа

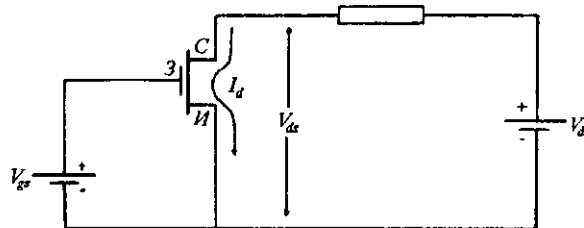


Рис. 3. Электронная диаграмма МДП ПТ: V_{gs} — напряжение на затворе; V_{ds} — напряжение стока—истока; I_d — ток стока

LaF_3 , AgCl , Si_3N_4 и др., являющиеся селективными к ионам фтора, серебра и водорода соответственно [9—12].

Многие чувствительные к H^+ материалы служат одновременно эффективными барьерами, препятствующими диффузии ионов и воды. Поэтому их часто используют одновременно в качестве верхнего слоя подзатворного диэлектрика ИСПТ и как капсулирующее вещество, проводя нанесение на стадии обработки кремниевой пластины методом химического осаждения из газовой фазы или окисления в сочетании с литографией. Для того же, чтобы придать ИСПТ способность различать другие химические вещества, применяют ионоселективные мембраны и биоматрицы, которые наносятся поверх подзатворного диэлектрика и прикрепляются к нему физико-химической адгезией. В этом случае именно такие дополнительные мембраны являются селективными к необходимому веществу и отвечают за образование продукта, который можно зарегистрировать.

Технологии создания ИСПТ. Основные технологии, используемые при создании ИСПТ, — это классические микроэлектронные технологии интегральных схем. В процессе создания полупроводниковых приборов и ИС можно выделить четыре этапа: 1) постановка задачи, определение целей устройства и его функциональных возможностей; 2) проектирование схемы, разработка топологии, изготовление шаблонов; 3) изготовление ИС; 4) сборка, упаковка в корпус, контроль параметров, испытания надежности.

Интегральные схемы построены из тонких слоев (обычно толщина их не более 1 мкм) металлов, полупроводников и диэлектриков разной формы на подложке, как правило, кремниевой. Ключевыми при их изготовлении являются изготовление шаблонов, формирование рисунка и этапы химической обработки пластины. Получение ИС может включать до 10 и более процессов литографии. Общее количество технологических операций при изготовлении, например, полевого транзистора составляет

около 30. Сюда входят термоокисление кремния, ионная имплантация поверхности пластины через маску, ионная диффузия, осаждение диэлектрических слоев из газовой фазы, напыление металла, промежуточные обработки.

Поверхность пластин кремния, используемых сегодня в промышленности, достигает размеров 150×150 мм. Формирование ИС производится сразу на всей поверхности. Пластины со сформированными ИС затем разрезают на отдельные кристаллы (чипы) площадью от одного до нескольких десятков миллиметров в квадрате. Каждый чип содержит ИС. Минимальная толщина линий рисунка, создаваемого с помощью микролитографии, может составлять от 2 мкм для оптических резистов до $5 \cdot 10^{-5}$ мкм для электронорезистов. Сами размеры полупроводниковых приборов при этом исчисляются микрометрами, а их количество на чипе может измеряться сотнями тысяч. Поэтому они являются очень перспективными в плане создания мульти-сенсоров.

Метод микролитографии применим в удивительно широкой области технологических задач для обработки самых различных материалов. Отличительной чертой изготавливаемых структур является их квазидвухмерность или планарность, поскольку отношение параметров, характеризующих рельеф поверхности пластины в направлении, перпендикулярном и параллельном поверхности, обычно не превышает 1:5. В то же время при работе с монокристаллическим кремнием существуют большие возможности для создания трехмерных микроструктур за счет его механической и химической обработки. Использование различных методов изотропного и анизотропного травления (в последнем случае травление монокристалла происходит перпендикулярно определенной кристаллографической плоскости) позволяет формировать многообразные по форме отверстия и углубления в пластине, мембраны микрометровой и субмикрометровой толщины, балочные структуры и прочее [13—15].

Поскольку, как упоминалось выше, ИСПТ есть в принципе МДП ПТ, то при их производстве применяют те же технологии. Различия касаются только затворной области. Большинство ИСПТ имеют сток, исток и затвор на одной стороне чипа, однако существуют ИСПТ с разнесенными по разные стороны подложки стоком—исток и затвором [16]. Очень важным элементом является выбор внешнего затворного диэлектрика, который располагается поверх оксида кремния. Этот материал должен быть чувствительным и селективным к тестируемым ионам, являться хорошим пассивато-

ром поверхности кремния и защищать от гидратации и миграции ионов к поверхности полупроводника. Прежде всего, исследовали классические материалы микроэлектроники, такие как Si_3N_4 [17], Al_2O_3 [18, 19], Ta_2O_5 [18, 20], ZrO_2 [21].

Хороший обзор по изучению характеристик pH ПТ с затворными областями из SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 и Ta_2O_5 представлен в начале 80-х гг. Мацуо и Эсаши [22]. SiO_2 оказался худшим материалом в плане pH-чувствительности, поскольку диапазон чувствительности составлял 25—48 мВ/pH с нелинейной зависимостью от pH. Si_3N_4 демонстрировал чувствительность в пределах 46—56 мВ/pH, а Al_2O_3 и Ta_2O_5 показали почти что идеальную чувствительность (53—57 и 56—57 мВ/pH соответственно). Подобные результаты получены и при сравнении чувствительности по другим ионам, отклику сенсора и долговременной стабильности. Во всех случаях SiO_2 был худшим материалом, а Al_2O_3 и Ta_2O_5 — лучшими. Но для практических целей был выбран Si_3N_4 , который, несмотря на средние результаты, наиболее хорошо изучен и широко используется в технологии ИС.

Очень сложным вопросом при переходе к промышленному выпуску биосенсоров на основе ИСПТ является капсулирование [23]. Трудность состоит в том, чтобы обеспечить хорошую электрическую изоляцию при работе сенсора в жидкости периферии кристалла, контактных площадок и выводных проводников, не повредив чувствительных областей сенсора. Также актуальным остается требование совместимости предполагаемого процесса капсулирования с групповой технологией ИС.

Изолировать сенсор от анализируемого раствора необходимо, так как для ИСПТ этот раствор является частью затвора, а между затвором и объемом полупроводника должна быть только емкостная связь и отсутствовать — гальваническая. В противном случае характеристики датчика резко ухудшаются. Электрическую пассивацию верхней и нижней поверхностей кристалла, кроме контактных площадок, обычно проводят, покрывая ее диэлектрической пленкой с низкой водо- и ионопроницаемостью, о чем уже упоминалось выше.

Контактные площадки стараются размещать по краю кристалла на наибольшем удалении от чувствительной области сенсора. Тогда после подсоединения выводов ультразвуковой или термокомпрессионной изоляцию можно провести с помощью эпоксидного или другого вязкого компаунда, не повредив чувствительных областей.

На рис. 4 представлены различные ИСПТ, изготовленные в НИИ Микроприбор (Украина) [24], лабораторией LAAS CNRS (Франция) [25],

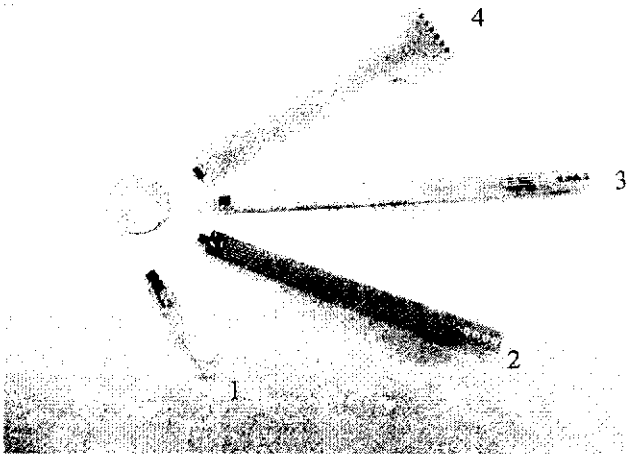


Рис. 4. Общий вид ИСПТ, изготовленных в НИИ Микроприбор (1), лабораторией LAAS CNRS (2), группой ESIEE (3) и в Институте материаловедения (4)

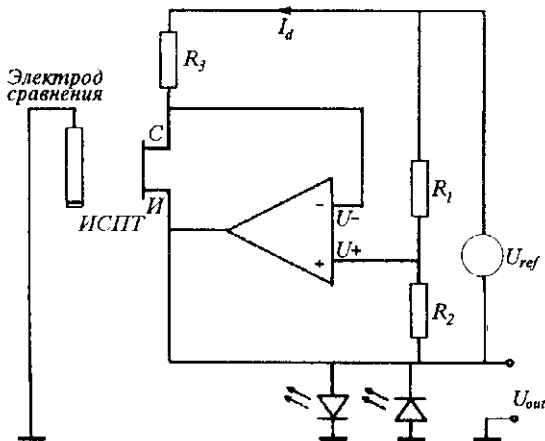


Рис. 5. Схема измерений для работы с ИСПТ

группой ESIEE (Франция) [26] и в Институте материаловедения (Вьетнам) [27].

Схемы измерений для работы с ИСПТ. Как упоминалось ранее, одним из основных преимуществ ИСПТ является возможность интеграции на одном чипе самого датчика со схемой усиления и обработки, используя кремниевые технологии микроэлектроники [28, 29]. Однако пока не существует коммерческого прибора с интегрированными датчиком и усилителем. Первый ИСПТ работал, используя отдельные компоненты и приборы, подключенные согласно схеме измерений, описанной Бергвельдом [30]. Эта схема запатентована фирмой Филипс, однако не нашла широкого применения. В настоящее время большим успехом пользуется более простая ее версия (рис. 5).

Операционный усилитель поддерживает вход-

ное напряжение равным нулю ($U+ = U-$), поэтому $U_{R1} = U_{R3}$ и $V_{ds} = U_{R2}$. Поскольку U_{R2} есть постоянная величина (так как она является частью V_{ref} , тоже постоянной величины), то V_{ds} — также постоянная величина. Кроме того, ток стока $I_d = U_{R3}/R_3$ — опять же константа, потому что $U_{R3} = U_{R1}$ (вторая часть V_{ref}). Благодаря такому подключению значение V_{gs} всегда поддерживается постоянным, автоматически регулируя потенциал истока в соответствии с любыми изменениями порогового напряжения V_t . Изменения в поверхностном потенциале оксида тут же очень точно отражаются на величине U_{out} . На практике часто используют величины $I_d = 100 \mu A$, $V_{ds} = 0,5 V$; результирующее выходное напряжение в этом случае $U_{out} = -1 V$ при pH 7. Диоды на выходе ограничивают выходное напряжение (соответственно и напряжение истока) в пределах от $-1,3$ до $+3,0 V$. На практике они в большинстве своем выполнены в форме светодиодов, сигнализирующих о выходе параметров системы из необходимых границ.

Проблемы влияния температуры, света, дрейфа на характеристики ИСПТ, как правило, часто решаются благодаря использованию дифференциальной схемы измерений (рис. 6).

В данной схеме для усилителей ИСПТ 1 и ИСПТ 2 можно использовать схему из рис. 5, выходы которой соединены с дополнительным дифференциальным усилителем. Псевдоэлектродом сравнения обычно служит платиновый электрод, напыляемый на общую для обоих датчиков часть чипа [5]. В работе [24] в качестве псевдоэлектрода сравнения использовали незакапсулированную часть подложки. Таким образом, благодаря использованию дифференциальной схемы измерений, с одной стороны, избавляются от относительно большого электрода сравнения и, с другой, — частично решают проблемы влияния различных факторов среды на характеристики сенсора.

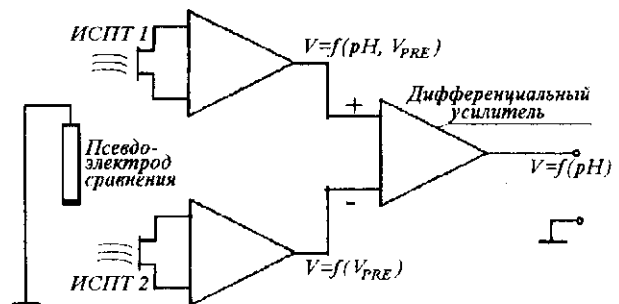


Рис. 6. Схема измерений для работы с ИСПТ в дифференциальном режиме

Ферментные биосенсоры на основе ИСПТ.
 Несмотря на то, что Яната и Мосс еще в 1976 г. высказали идею применения ИСПТ в качестве ферментного сенсора [31], подобные сведения не публиковались до 1980 г., когда вышла в свет первая работа по использованию ИСПТ как ферментного биосенсора для определения пенициллина [32]. В этом сообщении Карас и Яната описали прибор для определения пенициллина, состоящий из двух pH-чувствительных ИСПТ. Один преобразователь имел сверху подзатворной части мембрану с ковалентно связанными пенициллиназой и альбумином, а второй — только мембрану с ковалентно связанным альбумином. Такой прибор они назвали ферментным (энзимным) полевым транзистором — ЭНПТ (ENFET в английском варианте). Когда в растворе присутствовал пенициллин, то пенициллиназа в мембране катализировала его гидролиз. Это приводило к образованию протонов и соответственно к локальному уменьшению величины pH в области затвора, что и регистрировалось с помощью ИСПТ. Было также показано, что подобные ЭНПТ нуждаются в небольшом количестве фермента в мембране и могут использоваться многократно, что, несомненно, являлось большим преимуществом по сравнению с классическим ферментным анализом.

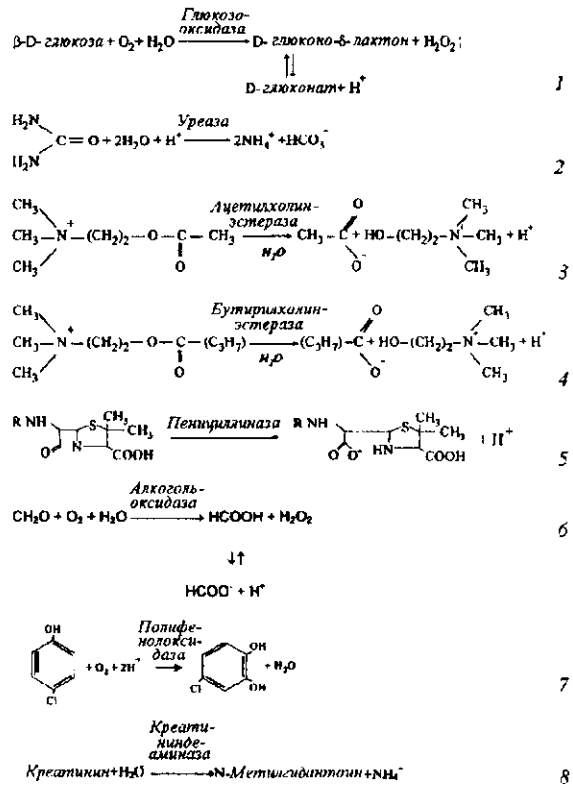
На первой международной конференции по химическим сенсорам, которая проходила в 1983 г. в г. Фикуока (Япония), уже были сделаны два доклада, посвященных биосенсорам на основе ИСПТ. В одном из них был представлен ЭНПТ для определения мочевины и ацетилхолина [33], в другом — ЭНПТ для определения глюкозы [34].

С 1985 г. наблюдается значительное увеличение количества публикаций, посвященных различным аспектам создания и работы ЭНПТ. Так, в работах [35—40] независимо публикуются обширные теоретические модели работы ЭНПТ, которые подтверждаются практическими данными. Ниже приведены некоторые схемы ферментативных реакций, на основе которых работают ЭНПТ.

В табл. 1 приведены данные по разработке различных биосенсоров на основе ИСПТ, полученные в разные годы.

Практическое применение ферментных сенсоров на основе ИСПТ осложняется тем, что обычно их отклик зависит от pH среды, ее буферной емкости, концентрации субстрата, а в случае, например, с глюкозой — и от концентрации косубстрата (кислорода).

Буферная емкость анализируемого раствора, в свою очередь, зависит от pH, следовательно, изменение pH в матрице с иммобилизованным фермен-



Схемы ферментативных реакций

том обусловлено исходной величиной pH пробы. Еще более существенной является pH-зависимость ферментативной кинетики: график зависимости скорости ферментативной реакции от pH имеет приблизительно колоколообразную форму, так что при большом изменении pH в матрице фермент может ингибироваться.

Предел чувствительности, время и величина отклика ЭНПТ зависят от большого числа факторов: скорости работы фермента, внешнего массопереноса (диффузии субстрата и буфера из объема раствора к поверхности мембраны), внутреннего массопереноса (диффузии субстрата, продукта и буфера внутри мембраны), толщины и пористости мембраны и т. д. Для хорошей работы биосенсора эти параметры надо оптимизировать.

Время отклика ЭНПТ составляет от одной до нескольких минут. Диапазон чувствительности по субстрату находится в пределах 10^{-6} — 10^{-1} моль/л и обычно сильно зависит от буферной емкости среды. Диапазон чувствительности по ингибиторам находится в пределах от 10^{-11} до 10^{-2} моль/л и зависит от используемого фермента и времени инкубации в растворе ингибитора.

Важным элементом создания ЭНПТ является выбор метода иммобилизации фермента на поверх-

Таблица 1
Данные по разработке ЭНПТ

Определяемое вещество	Фермент	Литературный источник
Глюкоза	Глюкозооксидаза	[36, 34, 41—44]
Мочевина	Уреаза	[33, 41, 45—48]
Пенициллин	Пенициллиназа	[32, 37, 49, 50]
Ацетилхолин	Ацетилхолинэстераза	[33, 51, 52]
Креатинин	Креатининдеминаза	[53—55]
4-Хлорофенол	Тирозиназа	[56, 57]
Формальдегид	Алкогольоксидаза	[58, 59]
Гипохлорит	Ацетилхолинэстераза	[60, 61]
Фосфорорганические пестициды	Ацетилхолинэстераза	[51, 52, 61]
Ионы тяжелых металлов	Уреаза	[52, 61, 62]
Гликоалкалоиды	Бутирилхолинэстераза	[63, 64]
Молочная кислота	Лактатдегидрогеназа	[65]
Треонин	Треониндеминаза	[66]
L-Глутаминовая кислота	Глутаминсинтетаза	[67]
Общий белок	Трипсин	[68, 69]

Таблица 2
Сведения о компаниях, занимающихся производством pH электродов на основе ИСПТ

Компания	Страна	Источник информации
IQ Scientific Instruments, Inc., San Diego	США	http://www.phmeters.com
Honeywell Inc., Fort Washington	США	http://content.honeywell.com
Beckman Coulter Inc., Fullerton	США	http://www.beckman.com
Mettler Toledo Inc., Columbus	США	http://www.mt.com
Lazar Research Laboratories, Inc., Los Angeles	США	http://www.lazarlab.com/
Spectrum Technologies, Inc., Illinois	США	http://www.specmeters.com
Belswan, Antwerpen	Бельгия	http://www.belswan.be
Horiba Ltd, Kyoto	Япония	http://global.horiba.com
RUN Elec, Carrieres sur Seine	Франция	http://www.run-elec.fr
Sentron Europe BV, Roden	Голландия	http://www.sentron.nl
Radiometer Nederland BV, Zoetermeer	Голландия	http://www.radiometer.nl/
Sera GmbH, Heinsberg	Германия	http://www.sera.de

ность датчика. С одной стороны, для иммобилизации на поверхность ИСПТ подходят все принципы и методы, обычно используемые при создании биосенсоров и детально описанные ранее [70, 71]. С другой стороны, для более полной реализации потенциала, заложенного в биосенсорах на основе ИСПТ, необходимо, чтобы изготовление ферментных биомембран удовлетворяло следующим условиям: 1) обеспечивало нанесение мембраны на нужный участок чипа сенсора; 2) обеспечивало хорошую адгезию мембраны к поверхности ИСПТ; 3) позволяло создавать мультисенсоры при условии нанесения на близкие участки поверхности чипа мембран различного состава; 4) было совместимым с групповой технологией интегральных схем.

Интересным в этом плане является подход, когда фотополимеризующийся раствор с ферментом наносят тонким слоем на структуру [72]. После экспозиции в ультрафиолетовом излучении через фотоматрицу и отмывки незаполимеризовавшегося раствора матрица с ферментом остается только над затвором транзистора. Также заслуживающим внимания является метод, при использовании которого альбуминовую матрицу с ферментом наносили сразу на всю пластину, а после полимеризации везде, кроме необходимых участков, фермент дезактивировали ультрафиолетовым излучением [73]. Очень перспективным видится и подход, при котором для иммобилизации мембран применяли модифицированную фотолитографию [74].

Заключение. Выше подробно описаны различные аспекты разработки ИСПТ и биосенсоров на их основе. В эти исследования включены многие лаборатории, получены хорошие и обнадеживающие результаты. Однако до сих пор не существует успешного коммерческого варианта биосенсора на основе ЭНПТ. Такое положение дел можно объяснить тем фактом, что очень сложно выйти на рынок и вступить в конкуренцию с традиционными приборами, какими являются, к примеру, стеклянные pH электроды, производством которых занимаются крупные корпорации. Поэтому различного рода инновациями обычно занимаются небольшие компании, не имеющие возможности вкладывать в разработки большие капиталы, из-за чего внедрение, как правило, затягивается. И только после того как приборы покажут свою конкурентоспособность, в их производство тут же включаются большие компании.

Так получилось с pH электродами на основе ИСПТ. Еще несколько лет назад не существовало их коммерческих вариантов, только экспериментальные образцы. Однако сейчас их производством и продажей занимаются несколько десятков компа-

Таблица 3

Сравнительный анализ рН электродов на основе ИСПТ и стеклянных электродов

Параметр	Стеклянный электрод	Электрод на основе ИСПТ
Размер	> 100 мм ²	< 1 мм ²
Форма чувствительной части	Круглая поверхность	Плоская поверхность
Импеданс	Очень высокий	Очень низкий
Чувствительность	59 мВ/рН	< 59 мВ/рН
Время отклика	Секунды	Миллисекунды
Возможность использования в качестве мультидатчика	Нет	Есть
Время подготовки	Сутки	Минуты
Капсулирование	Не требуется	Требуется
Производство	Индивидуальное	Массовое

ний, в том числе известных (табл. 2). Эти компании анонсируют в Интернете ряд преимуществ рН электродов на основе ИСПТ по сравнению со стеклянными рН электродами, а именно — неразбиваемость, портативность, быстрый отклик, простые условия хранения и чистки, измерения непосредственно в сложных водных образцах, а также полутвердых образцах, таких как сыр, мясо и т. д. (рис. 7, см. вклейку). В табл. 3 приведен сравнительный анализ двух типов рН электродов.

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что сейчас, когда уже существуют коммерческие варианты рН электродов на основе ИСПТ, будут предприняты попытки коммерциализации и биосенсоров на основе ЭНПТ. Правда, придется выдержать серьезную конкуренцию с амперометрическими биосенсорами, коммерческие варианты которых сейчас интенсивно применяются на практике. Поэтому необходимо широко использовать все преимущества биосенсоров на основе ЭНПТ по сравнению с другими типами датчиков, которые подробно описаны в данном обзоре. Особенно хотелось бы отметить возможность создания мультисенсоров на основе ЭНПТ и современных технологий микроэлектроники [73—75].

Часть этой работы выполнена благодаря финансовой поддержке украинско-французской государственной программы «Дніпро» и комплексной программы Национальной Академии Наук Украины «Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій».

S. V. Dzyadevych

Biosensors based on ion-selective field effect transistors: theory, technology, practice

Summary

The key theoretic principles of the work of ion-selective field effect transistor connected with their application in bioanalytical practice, some specifics of modern microtechnologies for their creation and measurement schemes with set-ups are discussed. The achievements in the creation of enzyme biosensors based on ion-selective field effect transistor and perspectives of their application are described in detail.

С. В. Дзядевич

Биосенсоры на основе ионоселективных полевых транзисторов: теория, технология, практика

Резюме

Розглядаються основні теоретичні принципи, які лежать в основі роботи іоноселективних полевих транзисторів та їхнє застосування в біоаналітичній практиці. Наведено деякі особливості найрозвиненіших мікротехнологій для їхнього виготовлення і схеми вимірів з необхідним апаратним забезпеченням. Детально описано досягнення в галузі розробки ферментних біосенсорів на основі іоноселективних полевих транзисторів та оцінено перспективи їхнього використання.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report) // Pure Appl. Chem.—1999.—71.—P. 2333—2348.
2. Bergveld P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements // IEEE Trans. Biomed. Eng.—1970.—17.—P. 70—71.
3. Bergveld P. Development, operation and application of the ion-sensitive field effect transistor as a tool for electrophysiology // IEEE Trans. Biomed. Eng.—1972.—19.—P. 342—351.
4. Matsuo T., Wise K. D. An integrated field effect electrode for biopotential recording // IEEE Trans. Biomed. Eng.—1974.—21.—P. 485—487.
5. Bergveld P. Thirty years of ISFETOLOGY. What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years // Sensors and Actuators B.—2003.—88.—P. 1—20.
6. Petersen K. E. Silicon as a mechanical material // Proc. IEEE.—1982.—70.—P. 420—450.
7. Middelhoek S. Celebration of the tenth transducers conference: the past, present and future of transducer research and development // Sensors and Actuators A.—2000.—82.—P. 2—23.
8. Шульга А. А., Стриха В. И. Современное состояние разработок биосенсоров на основе полупроводниковых структур // Биотехника — новое направление компьютеризации / Под ред. Г. Р. Иваницкого.—М.: Наука, 1990.—С. 63—82.
9. Covington A. K., Sibbald A. Ion-sensitive field effect transistors // Phil. Trans. Roy. Soc. London B.—1987.—316.—P. 31—46.
10. Janata J., Bezech A. Chemical sensors // Anal. Chem.—1988.—60.—P. 62—74.
11. Janata J., Huber R. Ion-selective field effect transistors // Ion-Selective Electrode Rev.—1979.—1.—P. 31—79.
12. Solid State Chemical Sensors / Eds J. Janata, R. Huber.—New York: Acad. press, 1985.—211 p.

13. Ko W. H. Solid-state physical transducer for biomedical research // *IEEE Trans. Biomed. Eng.*—1986.—33.—P. 153—162.
14. Takahashi K., Matsuo T. Integration of multimicroelectrode and interface circuits by silicon planar and three-dimensional fabrication technology // *Sensors and Actuators.*—1984.—5.—P. 89—99.
15. Wohltjen H. Chemical microsensors and microinstrumentation. // *Anal. Chem.*—1984.—56.—P. 87A—103A.
16. Cane C., Gracia I., Merlos A. Microtechnologies for pH ISFET chemical sensors // *Microelectronics J.*—1997.—28.—P. 389—405.
17. Tsukada K., Sebata M., Miyahara Y., Miyagi H. Longlife multiple-ISFETs with polymeric gates // *Sensors and Actuators.*—1989.—18.—P. 329—336.
18. Bousse L., de Rooij N. F., Bergveld P. Operation of chemically sensitive field effect transistors as function of the insulator-electrolyte interface // *IEEE Trans. Electron Devices.*—1983.—36.—P. 1263—1270.
19. Abe H., Esashi M., Matsuo T. ISFETs using inorganic gate thin films // *IEEE Trans. Electron Devices.*—1979.—26.—P. 1939—1944.
20. Gimmel P., Gompf B., Schmeißer D., Wiemhofer H. D., Gopel W., Klein M. Ta₂O₅-gates of pH-sensitive devices: comparative spectroscopic and electrical studies // *Sensors and Actuators B.*—1989.—4.—P. 195—202.
21. Akiyama T., Ujihira Y., Okabe Y., Sugano T., Niki E. Ion-sensitive field-effect transistors with inorganic gate oxide for pH sensing // *IEEE Trans. Electron Devices.*—1982.—29.—P. 1936—1941.
22. Matsuo T., Esashi M. Methods of ISFET fabrication // *Sensors and Actuators.*—1981.—1.—P. 77—96.
23. Bowman L., Meindl J. The packaging of implantable chemical sensors // *IEEE Trans. Biomed. Eng.*—1986.—33.—P. 248—255.
24. Shul'ga A. A., Netchiporuk L. I., Sandrovsky A. K., Abalov A. A., Frolov O. S., Koronenko Y. G., Maupas H., Martelet C. Operational of an ISFET with non-insulated substrate directly exposed to the solution // *Sensors and Actuators B.*—1996.—30.—P. 101—105.
25. Sant W., Pourciel M. L., Launay J., Do Conto T., Martínez A., Temple-Boyer P. Development of chemical field effect transistors for medical analysis // *The 16 Eur. Conf. on Solid-State Transducers.*—Prague, 2002.—P. 619—620.
26. Dzyadevych S. V., Mai Anh T., Soldatkin A. P., Duc Chien N., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M. Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds // *Book of XVI Int. Symp. on Bioelectrochem. and Bioenergetics.*—Bratislava, 2001.—P. 124.
27. Mai Anh T. Master Thesis, ITIMS, Hanoi Univ. of Technol.—Hanoi, 1999.
28. Wong H.-S., White H. A CMOS-integrated ISFET operational amplifier, chemical sensor employing differential sensing // *IEEE Trans. Electron Devices.*—1989.—36.—P. 479—487.
29. Bausells J., Carrabina J., Errchid A., Merlos A. Ion-sensitive field effect transistors fabricated in a commercial CMOS technology // *Sensors and Actuators B.*—1999.—57.—P. 56—62.
30. Bergveld P. The operational of an ISFET as an electronic device // *Sensors and Actuators B.*—1981.—1.—P. 17—29.
31. Janata J., Moss S. D. Chemically sensitive field effect transistors // *Biomed. Eng.*—1976.—6.—P. 241—245.
32. Caras S., Janata J. Field effect transistor sensitive to penicillin // *Anal. Chem.*—1980.—52.—P. 1935—1937.
33. Miyahara Y., Matsu F., Moriizumi T., Matsuoka H., Karube J., Suzuki S. Micro enzyme sensors using semiconductor and enzyme-immobilization techniques: Proc. Int. Meet. on Chem. Sensors (Fukuoka, Japan, September 19—22, 1983) // *Anal. Chem. (Symp. Ser.)*—1983.—17.—P. 501—506.
34. Hanazato Y., Shiono S. Bioelectrode using two hydrogen ion sensitive field effect transistors and a platinum wire pseudo reference electrode: Proc. Int. Meet. on Chem. Sensors (Fukuoka, Japan, September 19—22, 1983) // *Anal. Chem. (Symp. Ser.)*—1983.—17.—P. 513—518.
35. Caras S. D., Janata J., Saupe D., Schmidt K. pH-based enzyme potentiometric sensors. Theory // *Anal. Chem.*—1985.—57, pt 1.—P. 1917—1920.
36. Caras S. D., Petelenz D., Janata J. pH-based enzyme potentiometric sensors. Glucose-sensitive field effect transistor // *Anal. Chem.*—1985.—57, pt 2.—P. 1920—1923.
37. Caras S. D., Janata J. pH-based enzyme potentiometric sensors. Penicilline-sensitive field effect transistor // *Anal. Chem.*—1985.—57, pt 2.—P. 1923—1925.
38. Eddowes M. J. Response of an enzyme-modified pH-sensitive ion-selective device, consideration of the influence of the buffering capacity of the analytical solution // *Sensors and Actuators.*—1985.—7.—P. 97—115.
39. Eddowes M. J., Pedley D. G., Webb B. C. Enzyme-modified ISFETs: theoretical and practical consideration // *Anal. Proc.*—1986.—23.—P. 152—156.
40. Eddowes M. J. Response of an enzyme-modified pH-sensitive ion-selective device: analytical solution for the response in the present of pH buffer // *Sensors and Actuators.*—1987.—11.—P. 265—274.
41. Miyahara Y., Moriizumi T., Ichimura K. Integrated enzyme FETs for simultaneous detection of urea and glucose // *Sensors and Actuators.*—1985.—7.—P. 1—10.
42. Солдаткин А. П., Сандровский А. К., Шульга А. А., Стародуб Н. Ф., Стриха В. И., Ельская А. В. Глюкозный биосенсор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. Зависимость отклика биосенсора от состава анализируемого раствора // *Журн. аналит. химии.*—1990.—45.—С. 1405—1409.
43. Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A., Netchiporuk L. I., Nyamsi Hendji A. M. Glucose sensitive field effect transistor with additional NAFION membrane: reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range // *Anal. chim. acta.*—1993.—283.—P. 695—701.
44. Dzyadevych S. V., Korpan Y. I., Arkhipova V. N., Alesina M. Y., Martelet C., El'skaya A. V., Soldatkin A. P. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum // *Biosensors and Bioelectronics.*—1999.—14.—P. 283—287.
45. Anzai J., Okhi Y., Osa T., Nakajima H., Matsuo T. Urea sensor based on an ion sensitive field effect transistor. II. Effect of buffer concentration and pH on the potentiometric response // *Chem. Pharm. Bull.*—1985.—33.—P. 2556—2559.
46. Karube I., Tamiya E., Dicks J. M., Gotoh M. A micro-sensor for urea based on an ion-selective effect transistor // *Anal. chim. acta.*—1986.—185.—P. 195—200.
47. Солдаткин А. П., Бубряк О. А., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В., Сандровский А. К., Шульга А. А., Стриха В. И. Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // *Электрохимия.*—1993.—29.—С. 315—319.
48. Melo J. V., Soldatkin A. P., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S. Use of competitive inhibition for driving sensitivity and dynamic range of urea ENFETs // *Biosensors and Bioelectronics.*—2003.—18.—P. 345—351.
49. Архипова В. М., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П.,

- Ельская А. В. Ферментные биосенсоры для определения пенициллина на основе кондуктометрических планарных электродов и pH-чувствительных полевых транзисторов // Укр. биохим. журн.—1996.—68.—С. 26—31.
50. Gorchkov D. V., Soldatkin A. P., Maupas H., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Correlation between the electrical charge properties of polymeric membranes and the characteristics of ion sensitive field effect transistors or penicillinase based enzymatic field effect transistors // *Anal. chim. acta.*—1996.—331.—P. 217—223.
 51. Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet P., Shulgа A. A., Strikha V. I., Netchiporouk L. I., Soldatkin A. P., Wlodarski W. B. Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterases. // *Anal. chim. acta.*—1993.—281.—P. 3—11.
 52. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Jaffrezic H., Martelet C. Multi-biosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances // *Talanta.*—2001.—55.—P. 919—927.
 53. Kubo I., Karube I. Immobilization of creatinine diaminase on a substituted poly(methylglutamate) membrane and its use in a creatinine sensor // *Anal. chim. acta.*—1986.—187.—P. 31—37.
 54. Soldatkin A. P., Montoriol J., Sant W., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane // *Talanta.*—2002.—58.—P. 351—357.
 55. Soldatkin A. P., Montoriol J., Sant W., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric creatinine-sensitive biosensor based on ISFET and creatinine deiminase immobilised in PVA-SbQ photopolymeric membrane // *Materials Sci. and Eng. C.*—2002.—21.—P. 75—79.
 56. Mai Anh T., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Duc Chien N., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M. Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions // *Talanta.*—2002.—56.—P. 627—634.
 57. Dzyadevych S. V., Mai Anh T., Soldatkin A. P., Duc Chien N., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M. Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds // *Bioelectrochemistry.*—2002.—555.—P. 79—81.
 58. Korpan Y. I., Soldatkin A. P., Gonchar M. V., Sibirny A. A., Gibson T. D., El'skaya A. V. A novel enzyme biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive field effect transistors // *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*—1997.—68.—P. 209—213.
 59. Korpan Y. I., Dzyadevich S. V., Arkhipova V. N., Gonchar M. V., Gibson T. D., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Soldatkin A. P. Enzyme-based electrochemical sensors for formaldehyde detection // *Sensors and Materials.*—2000.—12, N 2.—P. 79—86.
 60. Soldatkin A. P., Gorchkov D. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. New enzyme potentiometric sensor for hypochlorite species detection // *Sensors and Actuators B.*—1997.—43.—P. 99—104.
 61. Солдаткин О. П. Биосенсоры на основі холінестераз для аналізу пестицидів, іонів важких металів та гіпохлориту // Біополімери і клетка.—1998.—14, № 1.—С. 23—28.
 62. Солдаткин О. П. Биосенсор на основі уреазы з покращеною чутливістю для аналізу іонів важких металів // Біополімери і клетка.—1997.—13, № 5.—С. 1—3.
 63. Korpan Y. I., Volotovskiy V. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Nazarenko E. A., El'skaya A. V., Soldatkin A. P. A novel enzyme biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-sensitive field effect transistors // *Bioelectrochemistry.*—2002.—55.—P. 9—11.
 64. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // *Biosensors and Bioelectronics.*—2003.—18.—P. 1047—1053.
 65. Kharitonov A. B., Zayats M., Alfonta L., Katz E., Willner I. A novel ISFET-based NAD⁺-dependent enzyme sensor for lactate // *Sensors and Actuators B.*—2001.—76.—P. 203—210.
 66. Kawabe T., Iijima N., Mitamura T. ISFET type threonine sensor using threonine deaminase from thermophilic bacterium // *Denki Kagaku.*—1985.—53.—P. 514—515.
 67. Iida T., Kawabe T., Noguchi F. ISFET-type L-glutamate sensor using thermophilic glutamine synthetase from thermophilic bacterium // *Nippon Kagaki Kaishi.*—1987.—10.—P. 1817—1821.
 68. Белоуван О. А., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В. Протеолитический биосенсор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. 1. Изучение сравнительных характеристик нативного и иммобилизованного трипсина для создания биосенсора // Укр. биохим. журн.—1996.—12, № 3.—С. 27—33.
 69. Белоуван О. А., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В. Протеолитический биосенсор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. 2. Характеристика работы в модельных условиях // Укр. биохим. журн.—1996.—12, № 4.—С. 25—30.
 70. Дзядевич С. В., Солдаткин О. П. Кондуктометричний метод у ферментативному аналізі // Укр. біохім. журн.—1994.—66, № 4.—С. 30—42.
 71. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов. // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 5.—С. 363—376.
 72. Hanazato Y., Nakako M., Maeda M., Shiono S. Glucose sensor based on a field effect transistors with a photolithographically patterned glucose oxidase membrane // *Anal. chim. acta.*—1987.—193.—P. 87—96.
 73. Kurojama T., Kimura J., Kawana Y. A single chip biosensors // *NEC Res. Devices.*—1985.—78.—P. 1—5.
 74. Nakamoto S., Ito N., Kuriyama T., Kimura J. A lift-off method for patterning enzyme-immobilized membranes in multi-biosensors // *Sensors and Actuators.*—1988.—13.—P. 165—172.
 75. Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Шувайло О. Н., Солдаткин А. П., Ельская А. В., Жафрезик-Рено Н., Жафрезик Г., Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 1.—С. 70—77.
 76. Kukla A. L., Kanjuk N. I., Starodub N. F., Shirshov Yu. M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions // *Sensors and Actuators B.*—1999.—57.—P. 213—218.
 77. Канюк М. І., Стародуб В. М., Кукла О. Л., Ширишов Ю. М. Потенціометричні напівпровідникові сенсори на основі ферментів // Укр. біохім. журн.—2002.—74 (46, част. 2).—С. 183—184.

УДК 577.15; 573.6
Надійшла до редакції 14.05.03