

## БІОСЕНСОРИ

## BIOSENSORS

---

---

УДК 577.151.35 + 543.257.5

### ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ПРАКТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ЛЮДИНИ

*В. М. Архипова<sup>1</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1</sup>, Д. А. Єфімов<sup>2</sup>, О. П. Солдаткін<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, м. Київ 03680, Україна,

<sup>2</sup>Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України, м.Київ  
E-mail: avalka@yahoo.com

### ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ПРАКТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ЛЮДИНИ

*В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, Д. А. Єфімов, О. П. Солдаткін*

**Анотація.** Вивчено можливості практичного застосування біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та глюкозооксидази для кількісного аналізу концентрації глюкози в зразках крові людини. Оптимізовано основні аналітичні характеристики розроблених біосенсорів, визначено оптимальні умови для проведення вимірювань з реальними зразками крові. Показано, що розроблений біосенсор можна з успіхом використовувати для аналізу глюкози в крові людини.

**Ключові слова:** глюкоза, біосенсор, глюкозооксидаза, рН-чутливий польовий транзистор, кровь.

### ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*В. Н. Архипова, С. В. Дзядевич, Д. А. Ефимов, А. П. Солдаткин*

**Аннотация.** Изучены возможности практического применения биосенсоров на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и глюкозооксидазы для количественного анализа содержания глюкозы в реальных образцах крови человека. Оптимизированы основные аналитические характеристики разработанных биосенсоров, определены оптимальные условия для проведения измерений в реальных образцах. Показано, что разработанный биосенсор можно с успехом использовать для анализа глюкозы в крови человека.

**Ключевые слова:** глюкоза, биосенсор, глюкозооксидаза, рН-чувствительный полевой транзистор, кровь.

## INVESTIGATION OF POSSIBILITIES OF APPLICATION OF POTENTIOMETRIC BIOSENSORS FOR GLUCOSE ANALYSIS IN BLOOD

*V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, D. A. Efimov, A. P. Soldatkin*

**Abstract.** The possibilities of practical application of biosensors based on pH-sensitive field-effect transistors and glucose oxidase for qualitative analysis of glucose in real blood samples have been studied. The main analytical characteristics of biosensors developed were optimized, and the optimal conditions of measurements in real samples were determined. It was shown that biosensor developed could be used for glucose analysis in human blood.

**Keywords:** glucose, biosensor, glucose oxidase, pH-sensitive field-effect transistor, blood.

### Вступ

Впродовж останніх років зростає потреба в простих, селективних, точних і надійних методах аналізу основних метаболітів людини для контролю стану здоров'я. Практична медицина, а також біотехнологія висувають як першочергове завдання розробку і створення нових діагностичних систем з високою специфічністю, чутливістю, експресністю, а разом з тим, щоб вони були дешевими, надійними, простими і мініатюрними. Такі вимоги можуть в повній мірі бути реалізовані з використанням біосенсорних пристроїв, які поєднують успіхи в розвитку багатьох напрямків біології та мікроелектроніки. Аналіз літературних даних дозволяє зробити висновок, що на сьогоднішній день найбільш перспективними є біосенсори на основі перетворювачів, які виготовляються з використанням технології мікроелектроніки [1]. Такими аналітичними системами можуть бути потенціометричні біосенсори на основі рН-чутливих польових транзисторів. Інтерес до розробки таких біосенсорів обумовлений низкою їх потенційних переваг: висока чутливість та селективність; відсутність необхідності у технологічно складному електроді порівняння; здатність до мініатюризації та високого рівня інтеграції; можливість створення мультисенсорів та розміщення на одному кристалі перетворювача разом із схемою обробки інформації; а головне, низька собівартість при масовому виробництві із застосуванням недорогої технології мікроелектроніки.

Серед розроблених науковими лабораторіями біосенсорів, безперечно, домінують датчики на глюкозу, тому що саме глюкоза є одним із найбільш важливих метаболітів живого організму, який найчастіше визначається у біологічних середовищах [2]. Крім того, глюкоза

є речовиною, яка найбільш часто використовується в харчовій промисловості та біотехнології, тому що в багатьох мікробіальних процесах ферментації та при рості клітинних культур саме вона є джерелом вуглецю. До того ж, саме глюкозний біосенсор був розроблений та описаний вперше [3], питанню розробки саме глюкозних біосенсорів було приділено найбільшу увагу, і саме глюкоза і фермент глюкозооксидаза є модельною системою при розробці всіх нових прототипів біосенсорів.

Але широке використання глюкозних біосенсорів на практиці лімітовано рядом їх недоліків. В деяких випадках це недостатньо висока чутливість та стабільність сенсорів, але частіше за все — вузький лінійний діапазон концентрацій, що визначаються. Також робочі характеристики відомих глюкозних біосенсорів дуже сильно залежать від умов середовища, а саме іонної сили, буферної ємності та рН, що потребує їх постійного врахування при проведенні процедури аналізу [4]. Тому метою роботи було дослідження можливості застосування розробленого глюкозного потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для роботи з реальними зразками крові людини.

### Матеріали і методи

#### *Матеріали*

В роботі використовували β-глюкозооксидазу (ГОД) із *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4) з активністю 130 од.акт./мг виробництва фірми “Діагностикум” (Львів, Україна), сироватковий альбумін бика (БСА), глюкозу та 25 % розчин глутарового альдегіду фірми “Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Steinheim, Germany. Як робочий буфер використовували калій-фосфатний

розчин ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ) вітчизняного виробництва. Всі інші реактиви були вітчизняного та імпортного виробництва і мали кваліфікацію “ос.ч.” чи “х.ч.”.

*Конструкція потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів*

В роботі використовували сенсорний чіп на основі рН-чутливих польових транзисторів, виготовлений за стандартною кремнієвою технологією в Науково-дослідницькому Інституті “Мікроприлад” (Київ, Україна) [5].

Він представляв собою кремнієвий кристал р-типу розміром 3 мм × 10 мм, на якому розміщено два ідентичних рН-чутливих польових транзистора (рис. 1). Чіп було наклеєно на ситалову підкладку розмірами 30 мм × 6 мм × 1 мм. Контакти кремнієвої структури було приєднано до відповідних площадок на ситаловій підкладці методом ультразвукового зварювання. Контактні області було ізольовано епоксидною смолою.

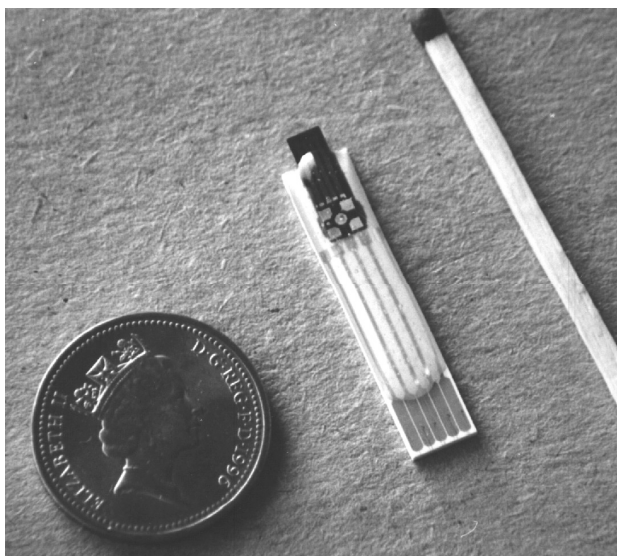


Рис. 1. Зовнішній вигляд потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів

Іоно-селективні властивості транзистора були обумовлені шаром  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , нанесеного на його підзатворну область. рН-чутливість приладу становила близько 50 мВ/рН, що забезпечувало достатню чутливість перетворювача для реєстрації змін рН в мембрані, які відбуваються в процесі ферментативної реакції. Робочі параметри:  $I_B = 100 \text{ мкА}$ ,  $U_{\text{вс}} = 1 \text{ В}$ .

Для роботи з цими перетворювачами в Інституті фізики напівпровідників було розроблено та виготовлено варіант двоканального портативного приладу для вимірювання відгуків сенсорних елементів на основі рН-чутливих польових транзисторів. Зовнішній вигляд розробленого приладу приведено на рис. 2. Прилад працює за принципом вимірювання поверхневого потенціалу затвору транзисторів по схемі стеження із від'ємним зворотним зв'язком, що підтримує струм каналу польового транзистора постійним на рівні 0,1 мА при постійній напрузі сток-виток біля 1В. Вихідний сигнал сенсора при цьому відповідає потенціалу на затворі. Прилад забезпечує можливість роботи як в диференційному режимі (з підсиленням різницевого сигналу у 10 чи 100 разів), так і в режимі моніторингу відгуків кожного з окремих двох каналів. Поточна інформація відображується на цифровому індикаторі та може бути зчитана на комп'ютер. На випадок використання транзисторів з різними електричними параметрами в приладі передбачена можливість роботи при різних напругах сток-виток (від 0,5 до 3,0 В) та різних струмах каналу (від 20 до 500 мкА). Для цього прилад забезпечений засобами внутрішнього контролю та настройки цих параметрів.



Рис.2. Зовнішній вигляд приладу для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами, виготовленого в Інституті фізики напівпровідників.

*Імобілізація глюкозооксидази на поверхню перетворювача*

Для створення біоматриць за основу було взято метод іммобілізації ферментів, розроблений в нашій лабораторії [6, 7]. Для цього готували розчини глюкозооксидази та БСА у 20 мМ

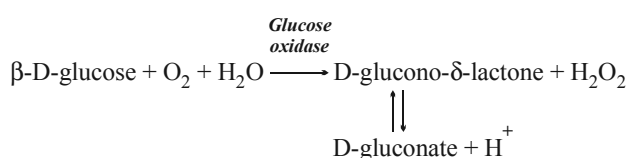
фосфатному буфері, рН 7,4 з кінцевими концентраціями 50 мг/мл та змішували у співвідношенні 1:1. До суміші глюкозооксидаза-БСА додавали гліцерин до кінцевої концентрації 10 % для стабілізації ферменту при іммобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Краплю суміші глюкозооксидаза-БСА наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача, на іншу — розчин БСА без ферменту (це був датчик порівняння). Для полімеризації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду на 20-30 хв. Після полімеризації датчики підсушували на повітрі й відмивали від надлишку глутарового альдегіду у буферному розчині протягом 10-20 хв.

#### Аналіз глюкози в зразках крові

Зразки крові з нормальним та підвищеним рівнем глюкози було отримано від різних пацієнтів, хворих на цукровий діабет, в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України. При вимірюваннях за допомогою біосенсора, в комірку з робочим буфером додавали аліквоту нерозведеної крові, плазми чи сироватки та отримували відгук біосенсора, який потім аналізували. Контрольні вимірювання концентрації глюкози проводили на комерційних портативних приладах FreeStyle Papillon Mini (ABBOTT, США) и Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Швейцарія).

#### Результати та обговорення

В основі роботи глюкозного біосенсора на базі рН-чутливих польових транзисторів лежить наступна ферментативна реакція:



Глюкозооксидаза розщеплює глюкозу до перекису водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, в свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється рН, яке можна реєструвати за допомогою рН-чутливого польового транзистора.

При аналізах глюкози в модельних буферних розчинах біосенсор демонстрував кла-

сичну кінетику ферментативної реакції і, відповідно, форму відгуків (Рис. 3а). Отримана калібрувальна крива демонструвала лінійність визначення глюкози у діапазоні концентрацій від 0,2 до 1 мМ (Рис.3б). Подальше збільшення концентрації глюкози призводило до насичення калібрувальної кривої, що пояснюється лімітуванням реакції ферментативного окиснення глюкози по кисню, що є косубстратом реакції [8].

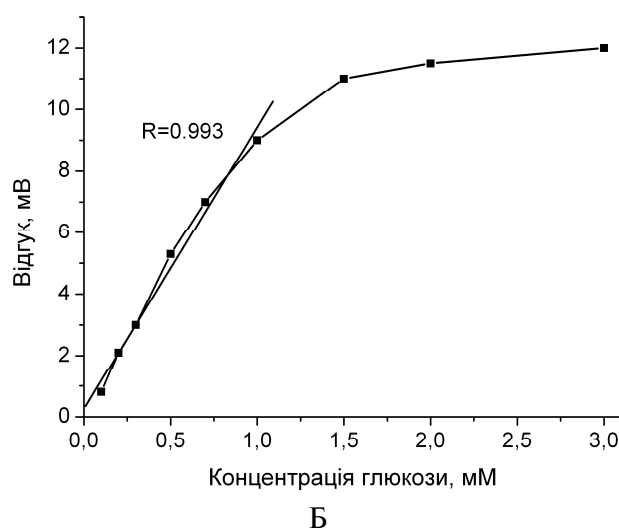
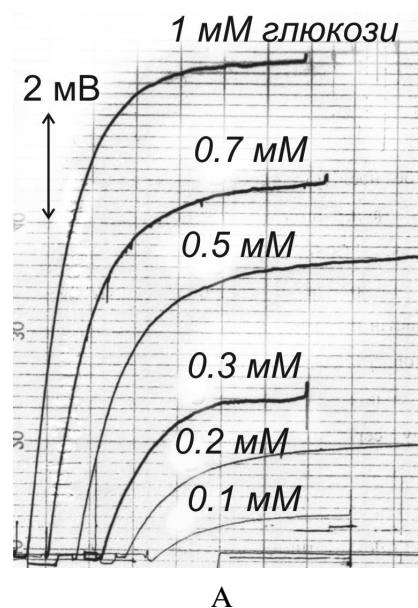


Рис. 3. Відгуки глюкозного біосенсора на внесення у комірку різних концентрацій глюкози (а) та відповідна їм калібрувальна крива визначення глюкози в модельних розчинах (б). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Розроблений глюкозний біосенсор демонстрував пристойні аналітичні характеристики при роботі з модельними розчинами, а саме ха-

рактизувався високою операційною стабільністю, стабільністю при зберіганні в оптимальних умовах та лінійним діапазоном, достатнім для визначення глюкози в крові при розведенні 1:40 та 1:20.

Однак все це відноситься до роботи біосенсора в модельних умовах. При роботі з реальними зразками цільної крові, плазми та сироватки крові з'являється ціла низка додаткових проблем. Перш за все, при роботі зі зразками крові існує проблема неспецифічного відгуку, форма якого (Рис. 4) відрізняється від форми відгуку на додавання модельного розчину глюкози (Рис.3а). У момент внесення зразка крові у комірку, сигнал сенсора спочатку падає, потім зростає, а потім знову падає. У цьому випадку досить часто незрозуміло, яку частину відгуку можна вважати за аналітично значущий сигнал біосенсора.

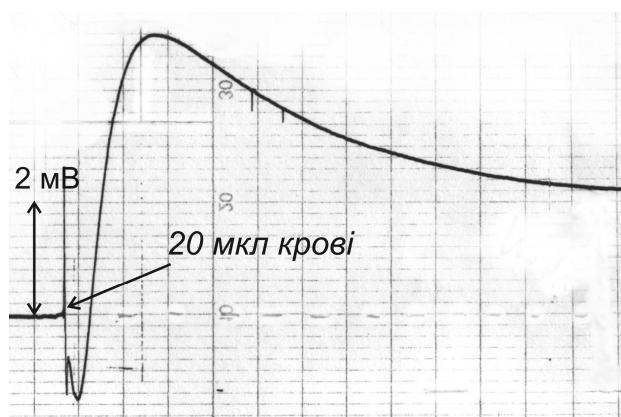


Рис. 4. Відгук біосенсора на внесення аліквоти крові у робочу комірку. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Крім того, при роботі зі зразками крові було відмічено, що різні біосенсори характеризуються різною величиною неспецифічного сигналу. При крапельному нанесенні біоселективної та референтної мембран на один і той же перетворювач отримували біосенсори, які характеризувались різною формою відгуків на внесення аліквоти крові. На Рис. 5 приведено криві відгуків двох різних біосенсорів, отримані в однакових умовах на внесення однакових аліквот одного і того ж зразку крові. Можна бачити, що в першому випадку неспецифічна складова відгуку практично відсутня, в другому — досягає 40% і навіть більше.

Слід відмітити, що при експериментах із модельними розчинами глюкози такого відгуку з

неспецифічною складовою не спостерігалось. Причини такої нестандартної форми відгуку на внесення аліквоти крові не зовсім зрозумілі, тому основні зусилля було направлено на визначення факторів, що призводять до формування такого неспецифічного відгуку, та пошуку підходів до зменшення його величини.

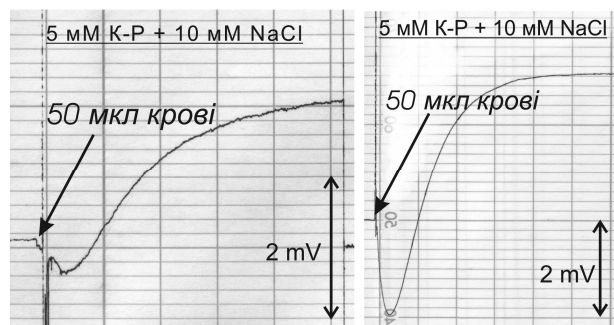


Рис. 5. Приклади типових відгуків біосенсорів з різними за товщиною та морфологією біоселективними та референтними мембранами.

Кров є досить складним об'єктом аналізу, тому що, з одного боку, до її складу входить велика кількість неспецифічних компонентів, а з іншого, — вона володіє багаторівневою буферною системою, що визначається карбонатами, фосфатами, гемоглобіном та іншими білками плазми крові (<http://www.xumuk.ru/biologhim/255.htm>). Було запропоновано змодельювати низькомолекулярний склад крові та подивитись, як внесення такого модельного розчину буде впливати на відгук біосенсора. Як безбілкову модель крові використовували PBS буфер (хлорид натрію — 137 мМ, хлорид калію — 2,7 мМ, фосфатний буфер — 10 мМ, рН 7,4 при 25°C). При внесенні у вимірювальну комірку 50 мкл PBS буферу спостерігався відгук, при якому спочатку мав місце стрибок сигналу біосенсору з досить швидким виходом до максимуму, а потім повільний зворотній процес (Рис. 6).

Це досить добра ілюстрація роботи біосенсора в диференційному режимі у відповідь на неспецифічний вплив. При внесенні в комірку з робочим буфером (5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4) розчину з достатньо високою іонною силою має місце різкий скачок сигналу за рахунок різниці провідності в мембранах та аналізованому зразку. Це швидкий етап сигналу. Потім, після досягнення максимуму за рахунок дифузії солей, в мембрані проходить повільне вирівнювання концентрацій солей в розчині та

в мембранах, і сигнал повертається до базової лінії. Таким чином внесення аліквоти розчину зі значно вищою іонною силою може призводити до появи неспецифічного перехідного сигналу, але за відсутності глюкози в зразку сигнал сенсора повертається до базового рівня. Швидкість цих процесів залежить від товщини мембрани.

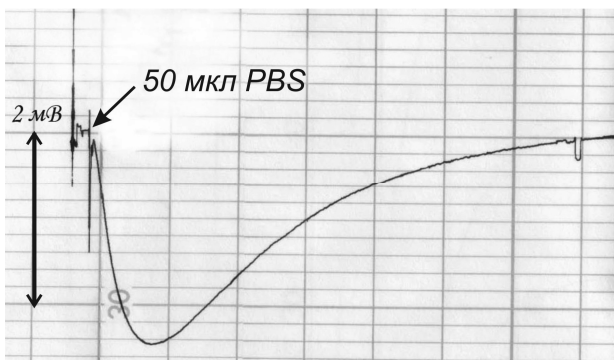


Рис. 6. Неспецифічний сигнал біосенсора на внесення аліквоти розчину з більш високою іонною силою. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Наступним кроком в наших дослідженнях була перевірка впливу високої концентрації білку в пробі на відгук біосенсора. В крові здорової людини в середньому міститься 7,5 % білку і 2% низькомолекулярних сполук [9]. Для дослідження впливу високомолекулярних фракцій на відгук біосенсора в вимірювальну комірку добавляли аліквоту крові та аліквоту модельного розчину, що містив 7 мМ глюкози та 8% сироваткового альбумину бика (Рис. 7). Експеримент проводили в такій послідовності. Спочатку вносили аліквоту крові і отримували сигнал незвичної форми. Потім відмивали сенсор, отримували стабільну базову лінію і вносили 50 мкл модельного розчину, що містив 7 мМ глюкозу і 8% БСА і отримали відгук класичної форми. Крім того, величина відгуку була ідентичною відгуку, отриманому на внесення 50 мкл розчину, що містив тільки 7 мМ глюкози.

Із отриманих даних можна зробити висновок про те, що білки в концентрації, відповідній їх вмістові в крові не вносять значного вкладу в неспецифічний сигнал біосенсора, або ж такий неспецифічний сигнал успішно компенсується диференційною схемою вимірювань.

При внесенні в вимірювальну комірку просто БСА до кінцевої концентрації 0,1% мав міс-

це невеликий неспецифічний сигнал (Рис. 8). Внесення на фоні такого неспецифічного сигналу (продукованого внесенням БСА) аліквоти глюкози призводило до появи класичного відгуку, при цьому він був ідентичним відгуку на внесення такої ж концентрації глюкози в буфер, що не містив білку.

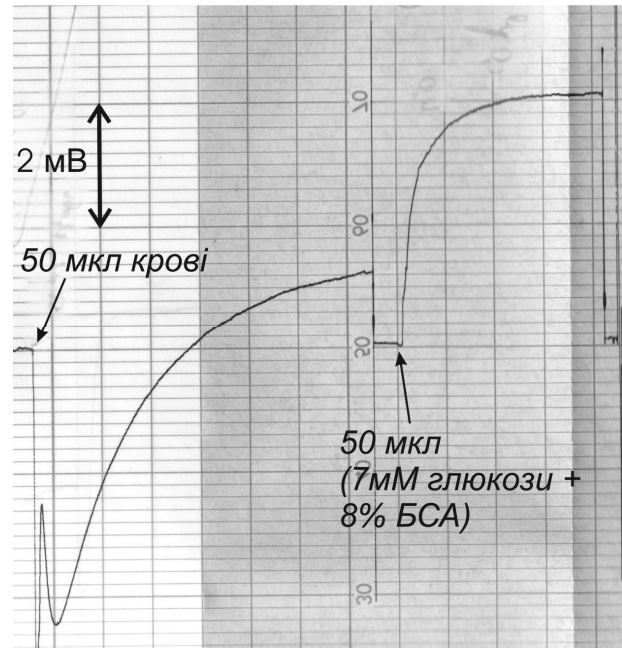


Рис. 7. Модельний експеримент з порівнянням відгуків на внесення аліквоти крові та модельного розчину, який імітує кров за вмістом білку та глюкози.

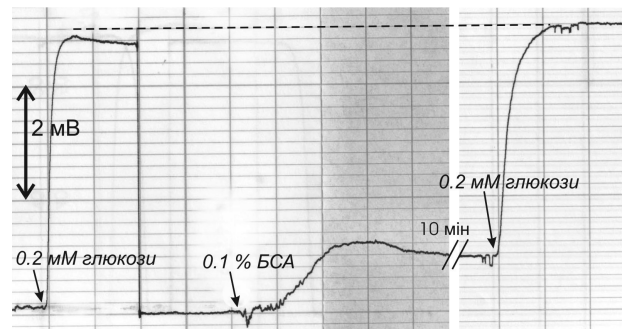


Рис. 8. Відгуки біосенсора на внесення в робочу комірку глюкози та БСА.

Таким чином, на підставі проведених експериментів, можна зробити висновок, що наявність високомолекулярної фракції (БСА) в аналізованому зразку в концентраціях, відповідних їх вмісту в крові, також призводить до неспецифічних сигналів, але вплив білків на форму та величину сигналу біосенсора значно менший ніж наявність високих концентрацій солі.

Наступним кроком досліджень було вивчення впливу складу робочого буфера на величину сигналу сенсора та його неспецифічну форму. Експеримент проводився таким чином. Готувались робочі буфера з різним складом: а) 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4; б) 5 мМ фосфатний буфер + 10 мМ-50 мМ NaCl, рН 7,4; в) 5 мМ фосфатний буфер + 10 мМ NaCl + 0,1-0,2% БСА, рН 7,4. В робочих буферах з різним вмістом в ньому NaCl і БСА стабілізувався базовий відгук, потім добавлялась аліквота плазми крові. Було показано, що найменший неспецифічний сигнал (порядку 20%) генерувався при внесенні плазми крові в робочий буфер, який містив 30 мМ NaCl і 0.1% БСА, тобто використання робочого буферного розчину з високою іонною силою може зменшити неспецифічний відгук сенсора. Крім того, було ще раз підтверджено, що присутність білку в робочому буфері великої ролі на формування форми відгуку не грає.

Дослідження відтворюваності відгуків та операційної стабільності роботи глюкозного біосенсора проводили в умовах визначення глюкози в модельних розчинах та реальних зразках крові. Як можна бачити з Рис. 9, як і в випадку модельних розчинів глюкози, так і аналізів із зразками крові біосенсор демонстрував високий рівень відтворюваності сигналів та операційну стабільність протягом кількох днів роботи.

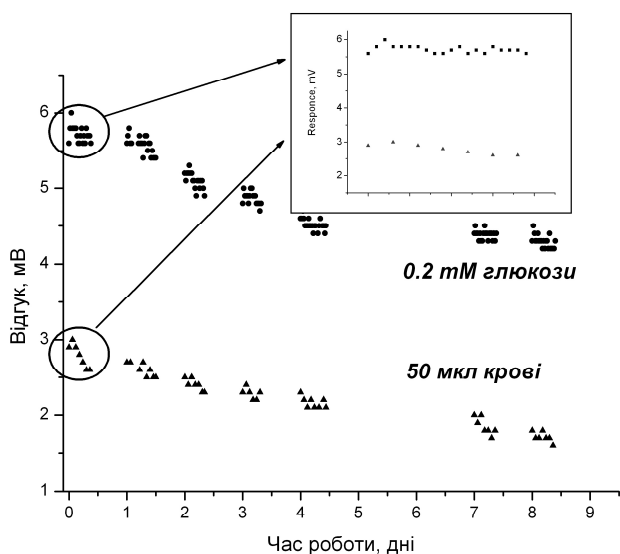


Рис. 9. Результати дослідження відтворюваності та операційної стабільності біосенсора при визначеннях глюкози в модельних розчинах та в зразках крові.

Також показано, що після проведення аналізів із зразками крові біосенсор повністю відмивався робочим буфером і демонстрував високі аналітичні характеристики при роботі з модельними розчинами, які не відрізнялись від відповідних, отриманих до роботи із зразками крові, тобто кров не впливає на роботу сенсора в цілому.

Результати по визначенню концентрацій глюкози в різних зразках крові, отримані за допомогою біосенсора, коррелювали з даними, отриманими контрольними методами, що дає можливість говорити о перспективності даного методу аналізу.

Таким чином показано, що при роботі із зразками крові з'являється неспецифічний відгук, величину якого можна зменшувати, підбираючи робочий буферний розчин з досить високою буферною ємністю. Причиною появи неспецифічного відгуку може бути факт ручного крапельного нанесення мембран і відсутність можливості контролювати розмір краплі, а, відповідно, товщину мембран, нанесених на поверхність перетворювача. Ферментна та референтна мембрани можуть бути різними за товщиною та морфологією, а це, в свою чергу, призводить до того, що при експериментах із зразками крові диференційна пара рН-чутливого польового транзистора працює не в повну силу, і отримується відгук біосенсора на внесення аліквоти крові з великою неспецифічною складовою, що в значній мірі ускладнює процедуру визначення глюкози в крові. Нанесення ж мембран, ідентичних за товщиною та морфологією, дасть змогу відсікати такі неспецифічні впливи і тому подальші кроки створення потенціометричних біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів повинні бути направлені на стандартизацію процесу іммобілізації ферментів, що є найважливішим питанням розробки біосенсорів та їх адаптації к реальним умовам функціонування.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми "Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб".

### Література

1. С.В.Дзядевич, О.П.Солдаткін Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів // Київ: Наукова думка. — 2006. — 255 с.
2. Schmid R.D., Karube I. Biosensors and "Bioelectronics" // *Biotechnology* / Eds. H.J. Rehm, G. Reed. — Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1988. — Vol.6b. — P. 317-365.
3. Clark L.C.Jnr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions // *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* — 1956. — Vol.2. — P. 41-48.
4. Дзядевич С.В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — Т.18, № 5. — С. 363-376.
5. Пацковський С.В., Фролов О.В., Шульга О.А., Солдаткін О.П., Дзядевич С.В. Розробка та дослідження рН-чутливих польових транзисторів // *Сенсорна мікроелектроніка та мікросистемні технології.* — 2005. — 3. — С. 66-73.
6. 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 // *Biosens. Bioelectron.* — 2003. — Vol.18. — P. 1047-1053.
7. Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J. — M., El'skaya A.V., Soldatkin A.P. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases // *Electroanalysis.* — 2004. — Vol.16. — P. 1873-1882.
8. A.P.Soldatkin, S.V.Dzyadevych, A.V.El'skaya, C.Martelet, N.Jaffrezic-Renault Pathways for improving potentiometric and conductometric enzymatic biosensors // *In: Encyclopedia of Sensors* (Eds. C.A.Grimes, E.C.Dickey, M.V.Pishko). — California, USA: American Scientific Publishers. — 2006. — V.7. — P. 331-348.
9. Хмелевский Ю.В., Усатенко О.К. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии. — Киев: Здоровье, 1987. — 160 с.