



УДК 621.3:531.1:577.1

НЕЭЛЕКТРОДНЫЕ БИОСЕНСОРЫ — НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

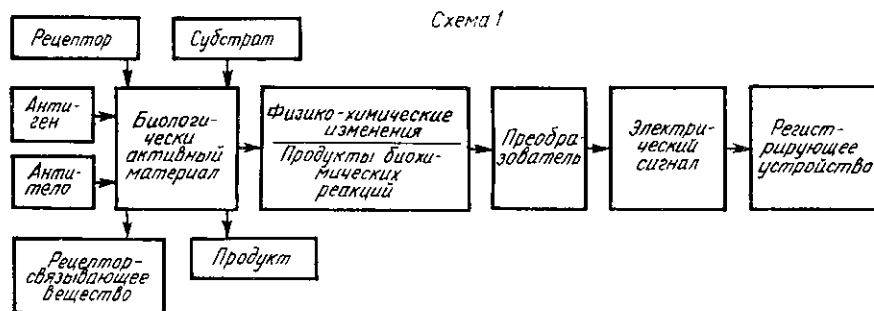
Н. Ф. Стародуб

Практическая медицина и биология, в частности биотехнология, выдвигают в качестве первоочередной задачи разработку и создание новых диагностических систем, обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, экспрессностью и вместе с тем являющихся дешевыми, надежными, удобными, простыми и миниатюрными. Это необходимо для ряда отраслей народного хозяйства, поскольку позволяет успешно решать проблемы регуляции технологических процессов, диагностики и лечения болезней, мониторинга окружающей среды. Перечисленные выше требования, предъявляемые к анализу, выполнимы на основе достижений иммунохимии [1, 2]. Однако в полной мере они могут быть реализованы лишь в биосенсорных устройствах, сочетающих успехи в развитии многих направлений биологии и электроники. Первые публикации в области биосенсоров появились еще в конце 50-х годов [3], но широкие исследования в ней развернулись лишь спустя более двух десятилетий. В настоящее время интерес к биосенсорам настолько велик, что вызвал обильный поток информации. На эту тему проведен ряд международных конференций, открыто издание специальных журналов ("Biosensors", "Sensors and Actuators" и др.). На Западе и в Японии уже функционируют фирмы по производству коммерческих вариантов биосенсорных устройств [4, 5]. Сообщается [6], что США ежегодно продают различных диагностических наборов на 4 млрд долларов, причем около 45 % их расходуется на внутренние нужды. Ожидается, что мировой рынок сбыта биосенсоров к 1990 году превысит рубеж в миллиард долларов. Получены патенты на создание биосенсорных устройств для определения более чем 170 соединений [7]. Существующее положение в области исследований по биосенсорам можно сравнить разве что с иммунохимическим «бумом», имевшим место после открытия Ялоу и Берсоном [8] радиоиммунного анализа.

Вопросы, касающиеся создания и практического использования электродных биосенсоров, широко обсуждались ранее у нас и за рубежом [4—6, 9, 10]. В недавно опубликованном обзоре [11] дано обоснование разработки нового поколения биосенсоров на полупроводниковых структурах, а также приведены общие принципиальные положения их устройства. Ниже предпринята попытка краткого изложения достижений по созданию различного рода неэлектродных биосенсорных устройств. Причем значительная часть материала посвящена характеристике конкретных диагностических тест-систем на основе полупроводниковых структур как наиболее перспективных вариантов, а также анализу достижений и путей развития исследований в этой области.

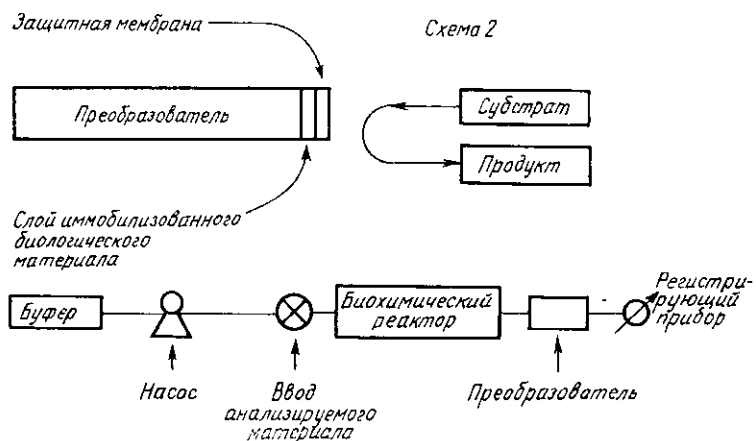
По определению биосенсор представляет собой устройство, содержащее биологически активный материал, появляющиеся продукты биохимических процессов с участием которого или непосредственно физико-химические изменения его самого преобразуются в электрический сигнал с помощью специального преобразователя и регулируются изме-

рительным прибором. Общий принцип работы биосенсора изображен на схеме 1.



Биологически активный материал может быть представлен самыми различными компонентами: ферментами, антителами, антигенами, рецепторными структурами, частями мембран, целыми клетками и даже кусочками тканей [12]. Возможно использование синтетических молекул в качестве структур, имитирующих биологически активные соединения. В химических сенсорных устройствах вполне допустимо применение в этом плане органических и даже неорганических соединений. В настоящее время испытываются самые разные способы включения биологически активного материала в биосенсоры [12, 13]. Это может быть простая адсорбция за счет гидрофобных ионных или полярных связей, либо инкапсуляция, допускающая заключение необходимых веществ между полупроницаемыми мембранами, механическое удерживание его внутри специально образованного полимера в результате химически индуцированных сшивок между самими биологическими структурами, а также ковалентная фиксация их на поверхности. Последний способ является наиболее распространенным, так как позволяет необратимо иммобилизовать материал при изменении pH, температуры, ионной силы раствора при наличии в нем детергентов. Вместе с тем с помощью этого метода достигается в определенной степени стабилизация биологических соединений при минимальной потере исходной активности в процессе иммобилизации.

Необходимо отметить, что биологический материал может быть иммобилизован как непосредственно на поверхности преобразователя, так и в специально приготовленной матрице на основе окислов кремния, полиакриламида, агарозы, сефарозы, коллагена, нейлона и других материалов. В последнем случае доступ продуктов биохимической реакции к преобразователю обеспечивается либо в результате непосредственного контакта с матрицей, либо с помощью определенной системы. В зависимости от этого различают [12] биосенсорные устройства типа биопробы или биосенсорной системы (схема 2). Биосенсоры разли-

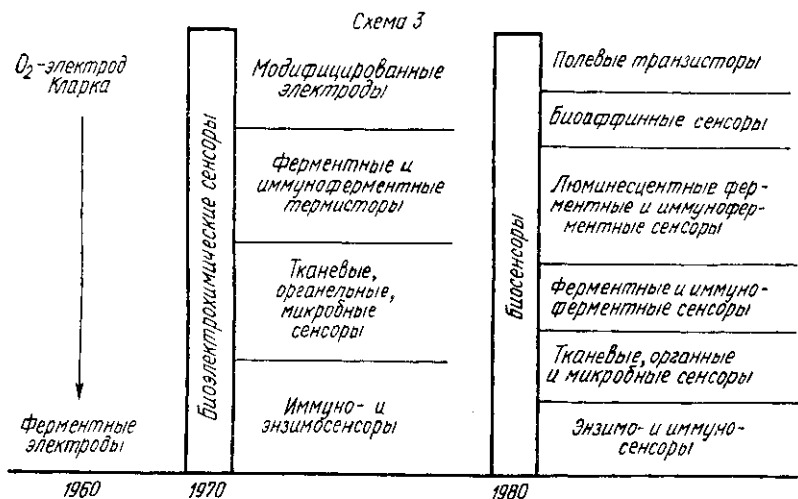


чаются и по природе иммобилизованного биологического материала, например, энзимо- и иммуносенсоры, биоаффинные, клеточные, органелльные, микробные и тканевые сенсоры. Возможны и комбинированные варианты типа иммуноэнзимных биосенсоров, когда образование иммунного комплекса выявляется по активности ферментов, предварительно конъюгированных с антителами или антигенами. Кроме того, выделяют электродные и неэлектродные биосенсоры.

Преобразователи могут регистрировать различные физико-химические параметры в иммобилизованном материале: изменение температуры, концентрации отдельных ионов, массы, оптических свойств и т. д. Детекция электродноактивных соединений обеспечивается так называемыми химическими сенсорами на основе электродной техники или полупроводниковых структур [12]. Причем они могут работать как на потенцио-, так и на амперометрическом принципах. В первом случае оценивается изменение потенциала, связанного с концентрацией анализируемого субстрата (S) и выраженного через активность определенного иона (a), в уравнении: $E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a$, а во втором — измеряется ток, величина которого определяется уравнением $I = k[S]$.

Такие физико-химические изменения биологического материала, как температура, масса и оптические свойства, регистрируются неэлектродными устройствами с применением пьезокристаллов, оптоволоконной техники, микрокалориметров [7, 10—14]. Особая роль в создании биосенсоров принадлежит полупроводниковым устройствам, интегрирующим преобразующую и регистрирующую функции. Наиболее широкое распространение для этих целей получают полевые транзисторы (ПТ).

Согласно анализу, проведенному Айзавой [15], развитие исследований в области биосенсоров в ретроспективном плане можно представить следующим образом (схема 3). Начало экспериментальных работ



относится к моменту появления кларковского электрода для измерения концентрации кислорода. На его основе предложены электроды с иммобилизованными ферментами. С 1970 года разрабатываются биоэлектрохимические сенсоры, включающие электроды с различными иммобилизованными биологически активными материалами. Спустя примерно десять лет появляются биосенсоры нового поколения на полупроводниковых структурах (диод Шотке, ПТ).

Основные тенденции в развитии биосенсоров заключаются в обеспечении высокой избирательности и чувствительности при миниатюрности датчика, проявляющего быстроту отклика, что позволяет проводить измерения в режиме реального времени, создавать имплантируемые и мультисенсоры на базе полупроводниковой технологии, достигая при

этом надежности и низкой стоимости изготавливаемых приборов [11, 12].

Остановимся подробнее на конкретных моделях неэлектродных биосенсорных устройств.

В биосенсорах на основе пьезокристаллов используют иммунохимическую реакцию [16]. С этой целью на поверхности кристалла иммобилизуют антиген или антитело. Образование иммунного комплекса определяют по изменению частоты колебаний пьезокристалла согласно выражению $Df/f = -Dm/A\rho t$, где Df/f — изменение частоты (Hz), Dm — массы (g), A — площадь с иммобилизованным материалом (см²), ρ — плотность кварца, t — толщина кристалла.

При иммобилизации на поверхности кристалла альбумина сыворотки удалось тестировать специфические антитела в антисыворотке, разведенной до 1:1000 [17]. Аналогичным способом, но в варианте с использованием конкурентно реагирующего вещества, достоверно регистрировали наличие в растворе 8 мкг/мл иммуноглобулина в качестве антигена [18]. Обнаруживаемая чувствительность соответствует таковой, присущей методу пассивной агглютинации, при этом измерения осуществляются в режиме реального времени и намного менее трудоемки. Правда, указанный выше принцип не может быть реализован для анализа низкомолекулярных антигенов и гаптен. Кроме того, при измерении колебаний пьезокристалла в жидкости чувствительность анализа снижается на порядок [19, 20]. Ввиду этого предпочтительнее формирование иммунного комплекса в растворе, а затем уже определение колебательных характеристик кристалла в воздухе.

Многие биохимические реакции являются экзотермичными (5—100 кДж/моль). Для регистрации выделяемого при этом тепла требуется чувствительность порядка -20°C , что обеспечивается специальными термисторами, выполненными в виде микрокалориметров (объемом 10 мкл). В биосенсорах, работающих на таком принципе, через микрокалориметр, содержащий биологический материал, пропускают анализируемый образец. Производительность их достигает 30 анализов в час.

Имеются сведения [22] о разработке биосенсоров на термисторах для определения концентрации целого ряда субстратов (аскорбиновой кислоты, АТФ, глюкозы, лактозы, креатина, мочевины и т. д.) с помощью иммобилизованных ферментов. В ряде случаев может быть осуществлена детекция анализируемого вещества при концентрации даже 2 нмоль/мл. При этом зона прямолинейной зависимости количества выделяемого тепла от концентрации субстрата имеет 3—100-кратный диапазон разведений. При использовании одного из компонентов, содержащего в качестве метки фермент, а другого — в иммобилизованном виде, удается в «конкурентном» варианте измерить таким же образом интенсивность иммунохимической реакции. В частности, биосенсоры на термисторах с иммобилизованными специфическими антителами позволяют в «конкурентной» реакции с антигеном, меченым ферментом, определять альбумин, инсулин, гентамицин в концентрациях 10 мкмоль/мл, 0,1 мкг/мл и 0,1—1,0 е. а./мл соответственно. Такой иммунохимический тест получил название TELISA (thermometric enzyme-linked immunosorbent assay) [23]. Показана принципиальная возможность его применения для определения содержания альбумина при концентрации 10^{-10} М, причем время, затрачиваемое на один цикл измерений, составляет всего лишь 10 мин. Правда, биосенсоры на термисторах чрезвычайно чувствительны к внешним колебаниям температуры, поэтому их конструкции пока что сложны, а отсюда дороги и неудобны в обращении.

Оптическое волокно датчики позволяют с высокой чувствительностью улавливать различного рода свечения, индуцируемые или изменяемые в ходе биохимических реакций, и поэтому представляют весьма удобный инструмент для диагностических исследований. Так, предложен тест на пероксид водорода [24]. Для этого на поверхности датчика были иммобилизованы пероксидаза и люминол, последний при появлении радикалов кислорода индуцировал свечение, по интенсивности ко-

того судили о количестве пероксида водорода в исследуемой жидкости. В работе [25] описано сконструированное авторами оптоволоконное устройство, содержащее белок конкававалин *A* и флуоресценци-меченный декстран. Глюкоза конкурировала с меченым декстраном за конкававалин *A*, и исследователи по изменению уровня флуоресценции оценивали ее содержание в анализируемом растворе. Время отклика такого устройства составляет 10 мин.

Несколько иной принцип работы оптоволоконного биосенсора описали Голдфинч и Лева [26]. На поверхность специальной мембраны, плотно контактирующей с оптическим детектором, иммобилизовали один из ферментов и трифенилметановый краситель: бромкрезоловый зеленый или бромтимоловый голубой. В результате ферментативной реакции локально изменяется величина pH, вызывая модификацию окраски красителя, по степени которой судят об уровне субстрата в среде. При иммобилизации на мембране пенициллина *G*, уреазы или глюкозооксидазы можно детектировать наличие соответствующих субстратов в концентрации от 0 до 10 мМ, если исходная ионная сила буферного раствора не превышает 1 мМ.

В последнее время предлагаются [27] варианты оптоволоконных биосенсоров с использованием так называемого принципа переноса энергии, когда флуорохром (эозин), возбуждаемый лучом с определенной длиной волны, имеет эмиссию в такой области спектра, где поглощает акцептор (основная форма фенолового красного). Интенсивность флуоресценции зависит от процесса переноса энергии, который весьма чувствителен даже к изменению на 0,01 единицу pH.

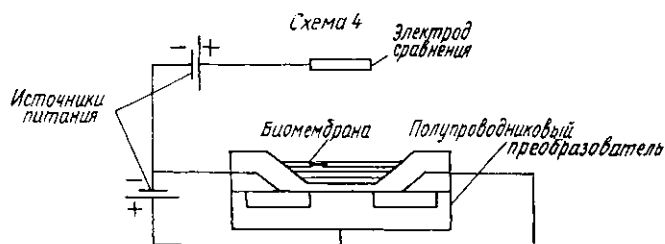
Разработан [28—32] также ряд вариантов биосенсоров с оптоволоконными датчиками на основе иммунохимических реакций. При проведении «прямого конкурентного» иммуноанализа один из компонентов этой реакции иммобилизуется на поверхности датчика, а второй — метится флуоресцирующим или люминесцирующим соединением. Интенсивность свечения зависит от концентрационных соотношений меченого и немеченого компонентов в растворе. При постановке анализа «сэндвичным» способом метятся «вторые», антииммуноглобулиновые, антитела. Тогда интенсивность свечения пропорциональна количеству мест связывания вторых антител и, следовательно, разведению специфических иммуноглобулинов в анализируемом растворе, если на поверхности датчика иммобилизован антиген. Она может быть пропорциональна и количеству исследуемого антигена, если иммобилизованы антитела и в реакции последовательно участвуют разновидности специфические иммуноглобулины. В первом случае иммунобиосенсоры определяют содержание антител, а во втором — антигенов. Возможны также варианты типа иммуноэнзимных биосенсоров, когда один из компонентов иммунохимической реакции мечен ферментом, детекция активности которого осуществляется индуцированным им изменением интенсивности свечения. При использовании в биосенсоре с оптоволоконным датчиком флуоресцентной метки в прямом конкурентном иммуноанализе удастся тестировать 270 мкмоль/мл иммуноглобулина *G*. В то же время в «сэндвичном» варианте чувствительность может быть на порядок повышена, а время, затрачиваемое на один анализ, увеличивается лишь в 3 раза, составляя 15 мин.

Весьма перспективным является создание оптико-электронных биосенсоров и, в частности, на основе принципов эллипсомерии, спектроскопии и флуоресценции внутреннего отражения, отражающей поверхности плазмона. При этом удастся измерить толщину слоя, индекс оптического отражения, спектры поглощения и флуоресценции тонких пленок на твердой фазе, константы оптического преломления поверхности. В отличие от фотометрии, когда основную информацию получают из оценки интенсивности света, в данном случае важным показателем служит изменение положения поляризованного света, отраженного от поверхности, особенности в спектрах поглощения и флуоресценции. Обычно на металлизированной или стеклянной поверхностях фор-

мируют сначала монослой антигена (антител), а затем — бислоем, представляющий иммунный комплекс. В результате этого средняя толщина образованной белковой пленки значительно увеличивается (на 3—30 нм). Анализ сведений о достижениях и перспективах развития исследований в области опико-электронных иммунобиосенсоров приведен в недавно появившемся подробном обзоре [6].

Опико-электронные иммуносенсоры и биосенсоры с опиковолоконными датчиками, безусловно, найдут в дальнейшем широкое применение, но пока что их конструкции имеют ряд недостатков, связанных с чувствительностью к наличию в анализируемой среде различных окрашенных соединений, сложностью, относительно низкой производительностью и дороговизной вследствие отсутствия налаженной технологии.

Указанные недостатки успешно преодолеваются в биосенсорах на ПТ, принципиальная схема которых показана на схеме 4. В ПТ про-



водимость контролируется электрическим полем между истоком и стоком. С областью затвора плотно контактирует мембрана, содержащая биологически активный материал, который может быть ковалентно пришит к ее кремниевой поверхности. Если в результате биохимической реакции происходит локальное изменение заряда, то это оказывает существенное влияние на характеристики полупроводника, что и поддается регистрации потенцио- или амперометрическим способом. Принципиально возможно возникновение электрического поля на границе раздела твердая фаза — электролит вследствие переноса заряда, специфической адсорбции ионов противоположного знака, адсорбции или ориентации молекул с собственно дипольным моментом, поляризации атомов и молекул. Перенос заряда осуществляется в случае использования ионообменных (селективных) материалов с фиксированным распределением зарядов, твердофазных структур без внутреннего диффузного потенциала, жидких мембран, мембрано-активных комплексов типа макроциклических соединений. Традиционно используемые в микроэлектронике материалы и, в частности, окислы кремния способны реагировать на присутствие некоторых ионов, главным образом, катионов водорода. Исходя из возможности реализации указанного принципа формирования электрического потенциала в области затвора, конструктивно биосенсоры на ПТ могут быть одно- и многослойными, с активными и пассивными реакционными зонами, с разной физико-химической природой процессов на границе раздела в зависимости от условий переноса нейтральных и заряженных частиц: проницаемыми, блокирующими, поляризуемыми и неполяризуемыми [11, 12].

Различают [33] три основные категории биосенсоров на основе ПТ: газо-, ионочувствительные и биохимические. По технологии изготовления они могут быть гибридными (представляющие чувствительную часть и усиливающий прибор) и интегральными (реализующие свойства поверхности, приповерхностного слоя или основной массы структуры полупроводника электронного устройства). При этом реализуются два механизма, ответственных за генерирование потенциала на затворе: эффект поля и диффузия через массу изолятора.

В настоящее время предложены опытные образцы биосенсоров на основе аммонийчувствительных палладиевых или иридиевых структур [34] для определения содержания аммиака либо мочевины и креатина при использовании в качестве биологически активного материала фер-

ментов: уреазы и креатинфосфокиназы соответственно. Объем пробы для исследования составляет 85 мкл, производительность — 15 анализов в час. При этом в цельной крови или плазме можно обнаружить креатин и мочевины после 25- и 1000-кратного разбавления соответственно. Пределы измеряемых концентраций креатина — 0,2—30 мкМ.

Ведутся широкие исследования по созданию биосенсоров на основе рН-чувствительных ПТ. Так, показана возможность определения уровня пенициллина в области концентраций 0,1—25 мМ при ионной силе буферного раствора 20 мМ. Время отклика датчика составляет всего лишь 25 с, а длительность его функционирования достигает двух месяцев [35]. Необходимо отметить, что при этом требуется совсем незначительное количество фермента ($2,5 \cdot 10^{-4}$ е. а.).

Описаны опытные варианты биосенсоров, чувствительных к ацетилхолину и мочеvine и изготавливаемых на основе ацетилхолинэстеразы и уреазы [36]. Область определяемых концентраций мочевины находится в пределах $5 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл при ионной силе буфера 10 мМ, время отклика 1 мин и срок службы датчика 28 дней.

Разработаны различные варианты химических сенсоров, чувствительных к O_2 , CO_2 , NO_2 и NH_3 . В частности, на основе ПТ, контактирующего с гидрогелем, включающим $NaHCO_3$ и $NaCl$, предложен [37] вариант измерительного устройства pCO_2 . Максимальное время его отклика всего лишь 40—60 с. Используя эффект изменения диэлектрических свойств Al_2O_3 и ряда полимерных материалов в зависимости от влажности, создан [38] вариант сенсора для регистрации этого параметра воздушной среды, причем при толщине слоя 10—20 нм время отклика датчика не более 40 с. Для биоаналитических исследований предложены на основе ПТ устройства, измеряющие присутствие аммиака и сероводорода в пределах 1—500 имп/мин. Сиббалд и соавт. [39, 40] сообщили о возможности применения ПТ в комплексе с ионоселективными мембранами для проведения индивидуального скрининга у пациентов уровня рН крови и содержания Ca^{2+} , Na^+ и K^+ , а также для одновременной оценки этих показателей в проточной ячейке, подвергаемой активной гепаринизации.

Заслуживают внимания также сведения [41] об определении биохимического потребления кислорода микроорганизмами, продуцентами органических кислот и иммобилизованными на рН-чувствительном ПТ.

Создание потенциометрических иммунобиосенсоров связано с выполнением следующих требований [42]: техническое обеспечение прямого измерения приповерхностной плотности заряда, ковалентная пришивка антител либо антигенов к неионной, инертной поверхности, заряд которой преимущественно должен определяться иммунохимической реакцией, а не обратимыми формированиями бислоя у твердой фазы. В этой связи представляет интерес описанная Айзавой и соавт. [43] триацетатцеллюлозная мембрана. Ее поверхностный заряд частично компенсируется в результате пришивки или иммобилизации антигена (кардиолипина), в дальнейшем эти изменения могут быть модифицированы при образовании комплекса с антителом, причем последнее происходит с интенсивностью, пропорциональной иммунохимической реакции. Правда, существенным недостатком описанного выше приема является зависимость поверхностного заряда от ионной силы, рН среды и ряда других факторов. Поэтому предлагается [44] так называемая квазиковалентная пришивка антигенов (антител) на инертную поверхность типа тефлона и перилена. Имеются определенные трудности в обнаружении изменения приповерхностного заряда в условиях физиологических растворов. Оно происходит на фрагментах иммобилизованных компонентов, которые внедряются на глубину нескольких нанометров в жидкую фазу. Разность потенциала создается лишь при изменении заряда в пределах бислоя, а толщина его достигает менее 2 нм. Все же полученные данные [42] свидетельствуют о том, что при концентрации буфера 0,1 М и ниже наблюдается рН-зависимый эффект потенциала при иммобилизации альбумина на затворе, покрытом периленом.

Следует отметить миниатюрность датчиков на основе ПТ, позволяющую конструировать имплантируемые [45] и мультिवарианты [46]. Нескольким энзимодатчикам удается расположить на площади $2,5 \times 2,5$ мкм. Важным обстоятельством является и то, что изготовление как моно-, так и мультибиосенсоров может быть весьма технологичным. В разработанных опытных устройствах для одновременного анализа содержания мочевины, глюкозы и ионов натрия использованы кремниевые на сапфире ПТ, поверхность затвора которых представлена в виде Si_3N_4 . Инкапсулирование устройства осуществляют с помощью эпоксидной смолы, а ферменты помещают в специальные ячейки глубиной до 75 мкм, формирование которых обеспечивают предварительным нанесением на поверхность затворов пленок фоторезисторного материала. Кроме того, для обеспечения технологичности процесса изготовления биологически активных матриц применяют фоточувствительный поливиниловый спирт. Правда, полимеры из него имеют ряд недостатков. Прежде всего, они достаточно плотны и затрудняют диффузию, а также подвержены быстрому старению. Ввиду чего биосенсорные устройства, включающие таким способом приготовленные биологически активные матрицы, характеризуются низкой чувствительностью и большим (около 15 мин) временем отклика.

Испытываются различные возможности непосредственной иммобилизации ферментов на поверхности затвора ПТ, модифицированной силанольными соединениями. В этом отношении представляют интерес запатентованные рядом зарубежных фирм автоматизированные приемы формирования биологически активного материала в полупроводниковых биосенсорных устройствах. Один из них заключается в том, что на инертной полимерной пленке, покрывающей поверхность затвора, с помощью плазменного пучка создается определенная плотность функциональных групп, способных обеспечить иммобилизацию ферментов, антигенов, аптител [47].

Теоретический анализ показал [48], что чувствительность и время отклика биодатчика на ПТ в основном определяются скоростью диффузии субстрата, кинетикой ферментативной реакции, интенсивностью обмена между генерируемым слоем протонов и буферным раствором. При концентрации последнего 10^{-3} — 10^{-2} М достигается чувствительность порядка 10^{-4} — 10^{-3} М. Поскольку на чувствительность биодатчика оказывает особое влияние ионная сила раствора исследуемого образца [49], то предпринимаются попытки подбора условий проведения анализа после разведения проб как забуференной, так и незабуференной солевой средой.

Указанные выше пределы чувствительности неэлектродных биосенсорных устройств пока либо не отличаются, либо всего лишь несколько превышают те, которые присущи традиционным методам анализа. В то же время другие его требования (специфичность, экспрессность, надежность, простота и т. д.) выполняются весьма эффективно. Так, длительность работы конкретного биосенсора, как уже указывалось, может достигать нескольких месяцев или измеряться несколькими тысячами анализов. Повышение ее может быть достигнуто либо стабилизацией биологически активного материала с помощью более адекватных приемов иммобилизации, либо в результате применения смешанных мембран, рассчитанных на определенный срок службы. Оптимальное время максимального отклика датчиков составляет ≤ 1 мин, а его варьирование обеспечивается изменением условий диффузии между анализируемой средой и преобразователем.

Следует отметить, что экспериментально достигаемой чувствительности в настоящее время вполне достаточно для децентрализованного, индивидуального определения в большинстве случаев физиологических концентраций биологически активных соединений в жидкостях и тканях живых организмов, а также для проведения мониторинга окружающей среды в режиме реального времени. Дальнейшие исследования в области создания и поиска оптимальных условий режима работы биосенсор-

ных устройств будут способствовать повышению их чувствительности. Теоретически возможно с помощью биосенсоров на основе ПТ детектировать различные вещества в концентрации 10^{-13} — 10^{-17} М, т. е. вплоть до нескольких тысяч молекул в 1 мл среды, что намного выше разрешения радиоиммунного анализа.

В случае биосенсоров на основе ПТ прямая или не прямая регистрация биохимических реакций осуществляется по изменению электрического состояния поверхности преобразователя. Разность потенциалов на границе электролит — SiO_2 обусловлена диссоциацией силанольных групп и выражается зависимостью в виде прямой с наклоном $-25 \div -40$ мВ/рН в области рН 2—9. Для Al_2O_3 , PtO_2 , TiO_2 и ряда других окислов, включая Si_3N_4 , находящихся применение в микроэлектронике, эта зависимость уже может достигать $-46 \div -68$ мВ/рН. Значительное увеличение чувствительности достигается за счет использования так называемого принципа каскадного усиления, когда в биохимическом процессе реализуется несколько последовательных катализируемых стадий. Кроме того, существенное значение имеет достижение стабильности физических параметров ПТ и устранение дрейфа характеристик преобразователей за счет надежного капсулирования датчиков, изготовления их вместе со схемой предварительной обработки сигнала на одном кристалле, разработки простых и надежных систем калибровки как набора, так и отдельных биосенсорных устройств.

Поток информации о разработке новых биосенсорных устройств на основе ПТ для различного рода медико-биологических применений постоянно растет. Однако следует отметить, что поступление на рынок неэлектродных биосенсорных устройств пока отмечается лишь в единичных случаях, да и то они предназначены для «внутреннего» пользования. Так, известно о продаже гипоксантинового датчика для оценки свежести рыбы [50], иммунобиосенсора [51] и клеточного биосенсора [52] для мониторинга окружающей среды, а также о некоторых других [4, 5, 53]. Видимо, массовый промышленный выпуск биосенсоров в значительной мере сдерживается рядом нерешенных технологических задач. В этой связи технология производства биосенсоров на основе ПТ выгодно отличается от технологии изготовления других неэлектродных устройств такого же типа. В частности, она включает такие преимущества, как миниатюрность размеров структуры ПТ и всего прибора, объединение чувствительной и регистрирующей частей, использование фотолитографии с высокой пространственной прецизионностью, совместимость с новыми микроэлектродными материалами, полимерами, естественными и синтетическими мембранами, воспроизводимость параметров ПТ, низкая их стоимость, возможность изготовления структур для мультидатчиков и их одновременная калибровка, выход сигнала на общий регистратор с единым процессором. Страны Западной Европы, США и Японии планируют 2—3-кратное наращивание с каждым годом выпуска биосенсорных устройств.

Прогресс в развитии биосенсоров различных видов определяется достижениями в области синтеза и изучения новых электродноактивных материалов, конструирования приборов, соответствующих обрабатывающих систем, совершенствования их технологии и в целом теоретическими и экспериментальными разработками, позволяющими в полной мере реализовать возможность ПТ. Особую значимость среди них приобретает поиск эффективных инкапсулирующих средств, совместимых с температурочувствительными биологическими структурами, технологических способов формирования в моно- и мультидатчиках полимерных матриц, включающих электродноактивный материал, его надежная защита с помощью пленок с целью повышения стабильности, срока службы, а также корректного и свободного выбора типа матриц (полимерный слой, гель) для использования в водной и газовой среде. То же касается и ковалентной прищипки к поверхности диэлектрика электродноактивного материала, создания новых его видов, обеспечения надежности адгезии между затвором ПТ и используемыми в био-

сенсоре полимерами, поддержания иммобилизованных биополимеров в стерильном состоянии с целью сохранения их, увеличения срока службы и т. д.

Автор выражает благодарность А. В. Ельской за идею написания обзора, обсуждение материала и ценные замечания.

THE NONELECTRODE BIOSENSORS AS A NEW TREND IN THE BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS

N. F. Starodub

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The development of one of the most important trends of nontraditional biotechnology — construction of a new generation of diagnostical systems on the basis of nonelectrode sensorial equipments is analyzed. Characteristics of principally different biosensors (on the thermistors, piezoelectric crystals, semiconductive structures, etc.) including enzymes and antibodies as biologically active material are discussed. Information about the construction, usage and development of biosensors on the semiconductive structures is underlain because of their high sensitivity, availability, for individual noncentralized screening in regime of real time using multi- and implanted detector and some other preferences (technologicity, simplicity, miniaturity, reliability, cheapness).

1. Стародуб Н. Ф., Ельская А. В. Иммунохимические аспекты скрининга экспрессии генов // Цитология и генетика.— 1988.— 22, № 5.— С. 64—72.
2. Белковий иммуноблот и иммунодот в биохимических исследованиях / Н. Ф. Стародуб, В. П. Артюх, В. И. Назаренко, Л. И. Коломиец // Укр. биохим. журн.— 1987.— 57, № 3.— С. 108—120.
3. Smith O. H. Biological transducers and coding // Biophys. Sci. A study program / Ed. O. Wiley.— New York, 1959.— P. 110—115.
4. Albery J., Haggett B., Snook D. You know it makes sensors // New Scientist.— 1986.— 109, N 1495.— P. 38—41.
5. Scott A. Biosensors: a tool for the food and beverage industries? // Lab. Pract.— 1985.— 34, N 6.— P. 39—43.
6. Place J. F., Sutherland R. M., Dahne C. Opto-electronic immunosensors: a review of optical immunoassay at continuous surfaces // Biosensors.— 1985.— 1, N 2.— P. 321—353.
7. Davis G. Advances in biomedical sensor technology: review of the 1985 // Ibid.— 1986.— 2, N 2.— P. 101—124.
8. Yalow R. S., Berson S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man // Clin. Invest.— 1960.— 39, N 4.— P. 1157—1175.
9. Ярополов А. И., Березин И. В. Пути и перспективы использования биокатализаторов в электрохимических системах // Успехи химии.— 1985.— 54, № 9.— С. 1448—1465.
10. Frew J. E., Allen H., Hill O. Electrochemical biosensors // Anal. Chem.— 1987.— 59, N 4.— P. 933 A.
11. Стрїха В. І., Шувальо А. А. Біосенсори на основі напівпровідникових структур // Вісн. АН УРСР.— 1988.— № 2.— С. 21—34.
12. Winquist F. Biosensors based on thermistors and semiconductor structures. Dissertation N 158.— Linköping: Linköping studies in science and technology, 1987.— 100 p.
13. Biosensors / M. Mela, M. Huotari, P. Ryymin, J. Turunen // Acta Univ. Oul.— 1986.— N 179.— P. 127—138.
14. Frew J. E., Hill H. A. O. Electron transfer biosensors // Phil. Trans. Roy. Soc. London B.— 1987.— 316.— P. 95—106.
15. Aizawa M. Molecular recognition and chemical amplification of biosensors // Chem. sensors: proc. int. meet.— Fukuoka etc, 1983.— P. 683—692.
16. Owen V. M. Non-electrode biosensors in clinical biochemistry // Ann. Clin. Biochem.— 1985.— 22, N 3.— P. 559—564.
17. Shons A., Dorman F., Najarian J. An immunospecific microbalance // J. Biomed. Mater. Res.— 1972.— 6, N 3.— P. 565—570.
18. Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins / H. Muramatsu, J. M. Dicks, E. Tamiya, I. Karube // Anal. Chem.— 1987.— 59, N 23.— P. 2760—2763.
19. Roederer J. E., Bastianas G. J. Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals // Ibid.— 1983.— 55, N 16.— P. 2333—2336.
20. Calabrese G. S., Wohltjen H., Roy M. K. Surface acoustic wave devices as chemical sensors in liquids. Evidence disputing the importance of Reyleigh wave propagation // Ibid.— 1987.— 59, N 6.— P. 833—837.
21. Mosbach K., Danielsson B. Thermal bioanalysis in flow streams // Ibid.— 1981.— 53, N 1.— P. 83—94.

22. Mosbach K., Mandenius C. F., Danielsson B. New biosensor devices // Biotech. 83: Proc. Int. conf. commer. appl. impl. biotech. inst.—New York, 1983.—P. 665—678.
23. Thermometric enzyme linked immunosorbent assay: TFLISA / B. Mattiasson, C. Borrebaeck, B. Sanfridson, K. Mosbach // Biochim. et biophys. acta.—1977.—483, N 2.—P. 221—227.
24. Freeman T. M., Seitz W. R. Chemiluminescent fiber optic probe for hydrogen peroxide based on the luminol reaction // Anal. Chem.—1978.—50, N 9.—P. 1242—1246.
25. Schultz J. S., Mansuori S., Goldstein I. J. Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites // Diabetes Care.—1982—5.—P. 245—253.
26. Goldfinch M. W., Lowe C. R. Solid phase optoelectronic sensors for biochemical analysis // Anal. Biochem.—1984.—138, N 3.—P. 430—436.
27. Jordan D. M., Walt D. R., Milanovich F. P. Physiological pH fiberoptic chemical sensor based on energy transfer // Anal. Chem.—1987.—59, N 3.—P. 437—439.
28. Sutherland R., Dahne C., Place J. Preliminary results obtained with a no-label homogeneous, optical immunoassay for human immunoglobulin // Anal. Lett.—1984.—17, N 1.—P. 43—53.
29. Schultz J. Fiberoptic biosensors in artificial organs // ASAIO Trans.—1986.—32, N 2.—P. 705—710.
30. Peterson J. I. Fiberoptic chemical sensors. A view from the past to the future // Proc. symp. biosens.—Los Angeles etc: IEEE press, 1984.—P. 35—39.
31. Krul U. J., Bloore Ch., Gumbs G. Supported chemoreceptive lipid membrane transduction by fluorescence modulation: the basis of an intrinsic fibre-optic biosensor // Analyst.—1986.—111, N 2.—P. 259—261.
32. Fibre-optics and optical sensors in medicine / M. J. Martin, Y. A. D. Wickramasinghe, T. P. Newson, J. A. Crowe // Med. Biol. Eng. Comput.—1987.—25.—P. 597—604.
33. Cheung P. W. Semiconductor-based chemical sensors and their applications in medicine and biology // Proc. symp. biosens.—Los Angeles etc: IEEE press, 1984.—P. 13—17.
34. Winqvist F., Lundeström I., Danielsson B. Determination of creatinine by an ammonia-sensitive semiconductor structure and immobilized enzymes // Anal. Chem.—1986.—58, N 1.—P. 145—148.
35. Caras S., Janata J. Field effect transistor sensitive to penicillin // Ibid.—1980.—52, N 12.—P. 1935—1937.
36. Danielsson B., Winqvist F., Mosbach K. Enzyme transistors // Biotech. 83 Proc. Int. conf. commer. appl. impl. biotech. inst.—New York, 1983.—P. 679—688.
37. Matsuo T., Esashi M., Shibatani K. Catheter-tip pCO₂ and pO₂ sensors // Proc. symp. biosens.—Los Angeles etc: IEEE press, 1984.—P. 33—34.
38. Proceedings of International conference on solid-state sensors and actuators (Transducers, June 11—14, 1985).—Philadelphia: IEEE press, 1985.—281 p.
39. Sibbald A., Covington A. K., Carter R. F. Simultaneous on-line measurement of blood K⁺, Ca²⁺, Na⁺ and pH with a four-function Chem-FET integrated-circuit sensor // Clin. Chem.—1984.—30, N 1.—P. 135.
40. Sibbald A. Chemical biosensors and on-line patient monitoring // Med. Instrument.—1985.—19, N 4.—P. 164—167.
41. Microbial sensors / K. Riedel, R. Renneberg, P. Liebs, G. Kaiser // Stud. biophys.—1987.—119, N 1—3.—P. 163—166.
42. Sibbald A. Recent advances in field-effect chemical microsensors // J. Mol. Electronics.—1986.—2, N 1.—P. 51—83.
43. Aizawa M., Morioka A., Suzuki S. Enzyme immunosensors. Electrochemical determination of IgG with an antibody-bound membrane // J. Membrane Sci.—1978.—4, N 2.—P. 221—230.
44. Janata J., Huber R. J. Solid state chemical sensors.—New York: Acad. press, 1985.—211 p.
45. Clark L. C., Noyes L. K. Theoretical and practical bases for implantable glucose sensors with special reference to the peritoneum // Proc. symp. biosens.—Los Angeles etc: IEEE press, 1984.—P. 69—74.
46. Lundeström I., Spetz A., Winqvist F. Semiconductor biosensors // Phil. Trans. Roy. Soc. London B.—1987.—B316.—P. 47—60.
47. Kobos P. K. Enzyme-based electrochemical biosensors // Anal. Chem.—1987.—6, N 1.—P. 6—9.
48. Castner J. F., Wingard L. B., Jr. Mass transport and reaction kinetic parameters determined electrochemically for immobilized glucose oxidase // Biochemistry.—1984.—23, N 10.—P. 2203—2210.
49. Eddowes M. J. Response of an enzyme-modified pH-sensitive ion-selective device: consideration of the influence of the buffering capacity of the analyte solution // Sensors and Actuators.—1985.—7, N 2.—P. 97—115.
50. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system / I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki et al.—// J. Arg. and Food Chem.—1984.—32, N 3.—P. 314—319.
51. Owen V. M. Biosensors // Sensor Review.—1985.—5, N 1.—P. 20—24.
52. Karube I., Suzuki S. Immobilized enzymes for clinical analysis // Enzymes and immobilized cells in biotechnology / Eds A. I. Laskin, T. Benjamin.—California: Cumming publ. co. inc., 1985.—P. 209—226.
53. Ko W. H. Solid-state physical transducers for biomedical research // Trans. Biomed. Eng.—1986.—33, N 2.—P. 153—162.