

**О. Ю. Кутова**<sup>1</sup>  
**М. Г. Душейко**<sup>1</sup>  
**М. О. Семененко**<sup>2</sup>  
**Л. А. Столяр**<sup>3</sup>  
**В. І. Тимофєєв**<sup>1</sup>

## **ВПЛИВ ДОДАТКОВОГО БУФЕРНОГО ШАРУ НА ЧУТЛИВІСТЬ СЕНСОРА СРБ НА ОСНОВІ ІСПТ**

<sup>1</sup>Національний технічний університет України  
 «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»;  
<sup>2</sup>Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України, Київ;  
<sup>3</sup>ТОВ «Укрґентех», Київ

*Запропоновано й досліджено сенсор на основі іон-селективного польового транзистора (ІСПТ) для електронного детектування С-реактивного білка (СРБ). СРБ є маркером виявлення запальних процесів в організмі, а також дозволяє прогнозувати ймовірність виникнення серцево-судинних захворювань. Описано фізико-технологічні та топологічні особливості запропонованого сенсора на основі ІСПТ з підзатворним діелектриком  $\text{SeO}_2$ . Двоокис церію є перспективним матеріалом для використання в якості підзатворного діелектрика для МДН-транзисторів і має низку переваг у порівнянні з плівками двоокису кремнію, який широко використовується для виготовлення ІСПТ. Зокрема, більшу щільність поверхневих чутливих центрів, забезпечує кращу діелектричну ізоляцію структури, менший струм втрат через діелектрик, високу термічну та хімічну стабільність, біосумісність, а також ефективну іммобілізацію біохімічних елементів із застосуванням мембран при створенні біосенсорів. Це пояснюється тим, що сталі ґратки кремнію та оксиду церію близькі за значенням, що забезпечує низьку густину поверхневих станів на межі розділу діелектрик-напівпровідник. Проведено порівняльний аналіз експериментальних характеристик сенсора без та з використанням додаткового буферного шару (меланіну). Зображення обох поверхонь отримані за допомогою оптичного мікроскопа майже не відрізняються, за винятком того, що поверхня з меланіном має розвиненішу структуру. На основі цього було зроблено припущення про можливість осідання більшої кількості стрептавідину на поверхню і як результат — більшої кількості утворення пар антиген-антитіло, як однієї з основних реакцій, на яких базується робота біосенсорів. За результатами вимірювань визначено чутливість обох структур сенсорів і встановлено, що чутливість сенсора без додаткового шару становить 92 мВ/(мг/л), а з меланіном 204,4 мВ/(мг/л). Таким чином, шар меланіну підвищує чутливість сенсора більше ніж у 2 рази, а розроблений сенсор може ефективно застосовуватися для виявлення запалення в організмі людини на ранніх стадіях та аналізу ризику виникнення серцево-судинних захворювань, зменшуючи кількість смертельних випадків.*

**Ключові слова:** біосенсор, С-реактивний білок, меланін, чутливість.

### **Вступ**

Важливим елементом крові, який відповідає за запальні процеси в організмі є С-реактивний білок (СРБ). СРБ — це білок плазми крові, який відноситься до групи білків гострої фази, концентрація яких у крові різко збільшується за наявності запальних процесів чи травм.

В останні роки доведена важливість досліджень СРБ, оскільки він широко використовується у медицині і є маркером системного запалення. Швидка та точна діагностика СРБ є вирішальною для профілактики великої кількості захворювань, особливо для запобігання розвитку серцево-

судинних захворювань, туберкульозу, ревматоїдного артриту. Окрім того контроль рівня СРБ допомагає прогнозувати ймовірність виникнення злоякісних новоутворень, карциноми, саркоми [1]. Тому, тест на СРБ може замінити або доповнити традиційні аналізи, такі як визначення кількості лейкоцитів, швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ).

Основним та широковідомим методом визначення концентрації СРБ є імуоферментний аналіз (ІФА). Цей метод дозволяє виявляти білок-мішень за реакцією специфічної взаємодії антиген-антитіла, за рахунок введення в один з компонентів реакції ферментативної мітки з її подальшим виявленням за допомогою відповідного субстрату, який змінює свій колір. Середній час проведення дослідження досить тривалий і становить близько 2—3 год. [2]. Також в медичній практиці використовують досить сучасний швидший та чутливіший метод, який запропоновано у 2008 році, так званий *hs*-СРБ високочутливий метод вимірювання концентрації СРБ. Принцип дії методу полягає в використанні латексних частинок для підвищення чутливості методу та можливості детектування менших концентрацій [3]. Час проведення досліджень для цього методу становить від 10 хв до 15 хв. Хоча стандартний ІФА — це точний та чутливий метод, він вимагає від 50 мкл до 100 мкл клінічного матеріалу для кожного тесту. Окрім багатокоміркового ІФА аналізу існують аналізи з використанням проточних цитомірів для скорочення часу аналізу [4]. Проте висока вартість такого аналізу не дозволяє використовувати його для широкого загалу та гальмує його реалізацію як системи «лабораторія на чипі». Мікропотоківі системи — є перспективним напрямком для аналізу, оскільки вони характеризуються високою пропускнуою здатністю та потребують невеликої кількості реагентів для аналізу. Хоча деякі з них вимагають ручного відстеження крапель та інколи монотонної обробки зображень [5], тим не менш, вони є точними та надійними. Таким чином, кожен з методів хоч і має переваги в чутливості та точності, проте все ще не позбавлені недоліків, які не дозволяють швидко, якісно та з невеликими затратами ресурсів та часу зробити СРБ-аналіз.

У цій роботі запропонований сенсор СРБ на основі іон-селективного польового транзистора з підзатворним діелектриком  $\text{CeO}_2$ . ІСПТ, використаний в якості сенсора, виготовлений по стандартній КМОП технології з використанням в якості підзатворного діелектрика  $\text{CeO}_2$ . Порівняно з двоокисом кремнію шар  $\text{CeO}_2$  характеризується рядом переваг, зокрема, більшою щільністю поверхневих чутливих центрів, також забезпечує кращу діелектричну ізоляцію структури, характеризується меншим струмом витoku через діелектрик, високою термічною та хімічною стійкістю, а також ефективною іммобілізацією біохімічних елементів із застосуванням мембран при створенні біосенсорів. Як відомо, сталі ґратки кремнію та церію близькі за значеннями, що забезпечить їхню кращу адгезію під час виготовлення структури типу ІСПТ. Додатково для покращення чутливості сенсора методом центрифугування нанесено додатковий буферний шар (меланіну).

### Матеріали та метод

Сенсор СРБ являє собою іон-селективний *p*-каналний польовий транзистор виготовлений на кремнієвій пластині КЕФ, з питомим опором  $4,5 \text{ Ом} \cdot \text{см}$  з орієнтацією (111) та товщиною 450 мкм. В якості підзатворного діелектрика вибрана система  $\text{SiO}_2\text{--CeO}_2$  (з товщиною  $d_{\text{SiO}_2} = 10 \text{ нм}$ , та  $d_{\text{CeO}_2} = 50 \text{ нм}$ , відповідно).

Принцип роботи ІСПТ полягає в такому. Основна частина ІСПТ — напівпровідник з електронною провідністю (*n*-типу) в якому формуються дві області з дірковою провідністю, а саме витік і стік. Над каналом між ними розташований керувальний електрод-затвор (електрод порівняння) з нанесеною на область витік-стік досліджуваною речовиною. На шар діелектрика  $\text{SiO}_2\text{--CeO}_2$  наноситься іон-селективна мембрана. Зображення експериментальних зразків сенсорів подано на рис. 1.

Принцип роботи сенсора полягає в такому. Досліджуваний розчин контактує з іон-селективною мембраною, що приводить до виникнення на поверхні мембрани потенціалу, який впливає на силу струму, що протікає між стоком та виток. У свою чергу, мембранний потенціал залежить від активності досліджуваних іонів у розчині.

Перед початком вимірювань для утворення комплексу «антиген-антитіло» [6] на робочу поверхню, в область каналу, наносили зв'язувальний СРБ комплекс речовин: стрептавідин на 12 год та біотинильоване антитіло (15 хв) з проміжним змиванням нейтральним калій-фосфатним буферним розчином ( $\text{pH} \approx 7,4$ ). Для порівняння чутливості стандартного ІСПТ та ІСПТ з буферним шаром на частину зразків на підзатворний діелектрик перед нанесенням речовин для створення комплексу «антиген-

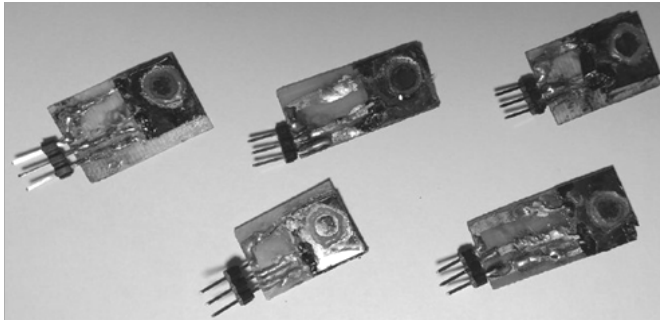


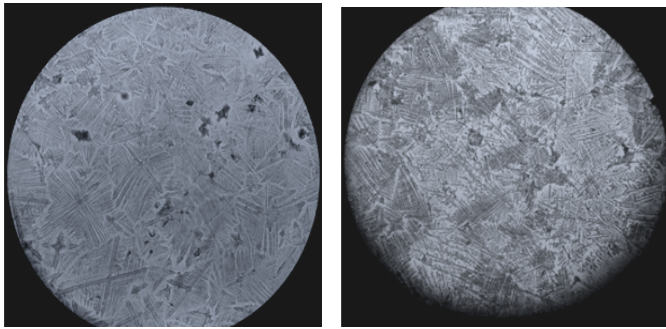
Рис. 1. Досліджувані зразки сенсора

хні проводилося безпосереднє вимірювання вихідних характеристик ( $I_c$ ) при зміщенні на затворі (лінійна ділянка робочої характеристики для ІСПТ) та з напругою між стоком і витком у діапазоні від 0 В до 3 В, для стандартного набору концентрацій антигену СРБ (відповідно: 0; 0,25; 1; 2,5; 10 та 25 мг/дм<sup>3</sup>), виготовленого компанією MyBioSource (США).

### Результати експериментальних досліджень

ВАХ для сенсора на основі ІСПТ (рис. 1) можна описати аналітичною залежністю для струму стоку як для звичайного МДН-транзистора в режимі насичення:

$$I_c = C_{ox} \mu \frac{W}{L} \left[ (U_{зв} - U_t) U_{св} - \frac{1}{2} U_{св}^2 \right], \quad (1)$$



а)

б)

Рис. 2. Знімки поверхні: а — з шаром стрептавідину; б — з шаром меланіну зі стрептавідином

де  $C_{ox}$  — питома ємність підзатворного діелектрика;  $\mu$  — приповерхнева рухливість носіїв;  $W$ ,  $L$  — ширина та довжина каналу;  $U_{зв}$  — напруга затвор-виток;  $U_t$  — порогова напруга;  $U_{св}$  — напруга стік-виток.

Зображення поверхні сенсора з нанесеним шаром стрептавідину та меланіну зі стрептавідином, отримані за допомогою оптичного мікроскопу (МКІ-2М), підтверджують їхню подібність. На основі цього зроблено припущення, про можливість адсорбції на такій поверхні сенсора з меланіном і стрептавідином більшої кількості стрептавідину (рис. 2б), що сприятиме адсорбції більшої кількості

антигену на поверхні у порівнянні з поверхнею лише з нанесеним шаром стрептавідину.

Для вимірювань електричних характеристик сенсора використовували вимірювальний комплекс Keithley 2410h.

Робочі характеристики та ВАХ для запропонованих структур сенсорів за різних концентрацій досліджуваної речовини показані на рис. 3, 4.

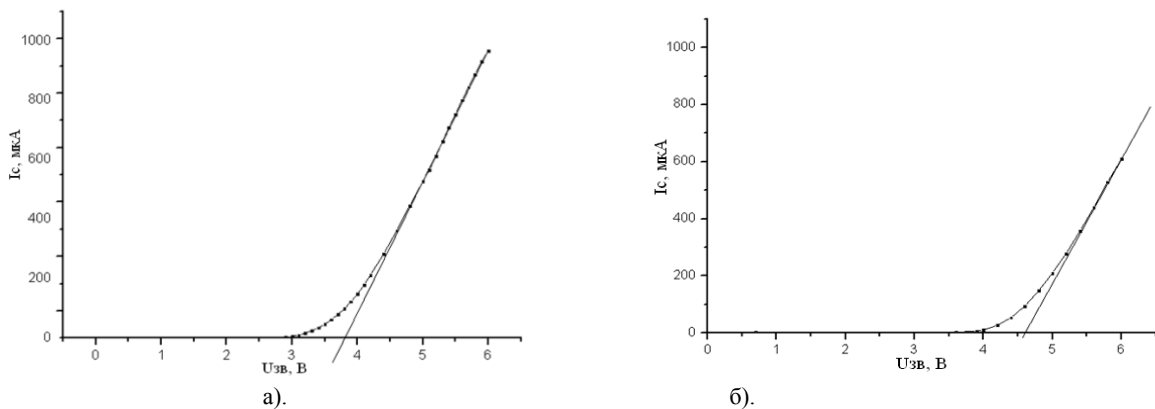


Рис. 3. Робочі характеристики для сенсора: а — без меланіну; б — з меланіном

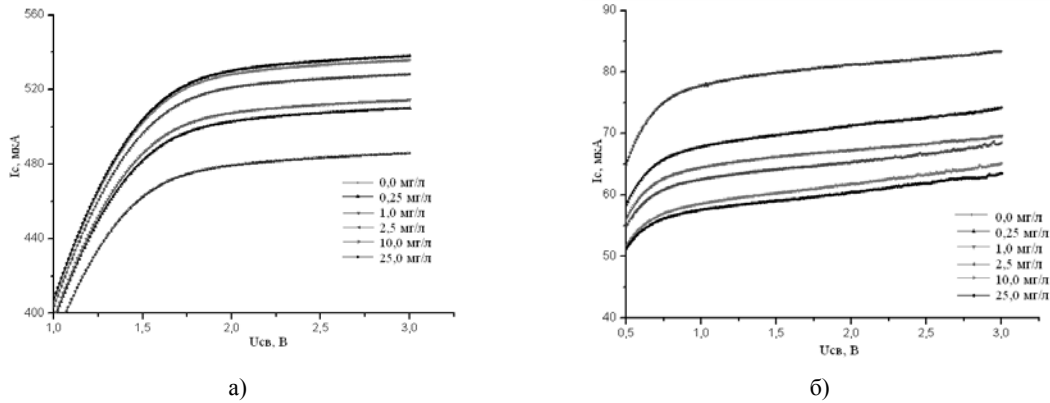


Рис. 4. ВАХ сенсора: а — без меланіну; б — з меланіном

Як випливає з рис. 4а, у випадку вимірювання сенсора без присутності меланіну зі збільшенням концентрації антигену збільшується значення струму. А за наявності меланіну на поверхні спостерігається зворотна залежність (рис. 4б) — збільшення концентрації зменшує струм сенсора. Це можна пояснити такими процесами, що відбуваються на його робочій поверхні:

– без буферного шару меланіну на комплексі «стрептавідин–антиген–антитіло» зростає негативний заряд і як наслідок привідкривається канал транзистора, що приводить до збільшення вихідного струму сенсора (рис. 4а).

– у випадку наявності буферного шару накопичення негативного заряду компенсується стоком електронів на вільні пастки в меланіні [8]. Це разом зі збільшенням товщини шару приводить до зниження величини негативного потенціалу на затворі і як наслідок — до зменшення струму (рис. 4б).

Для розрахунку чутливості розроблених сенсорів за фіксованого значення напруги між стоком та витокм  $U_{cv} = 3\text{В}$  та, використовуючи робочі характеристики ІСПТ, отримані залежності напруги затвору від концентрації білка  $U_3 = f(C)$  (рис. 5), які можуть бути описані простими алгебраїчними апроксимаціями за допомогою експоненти.

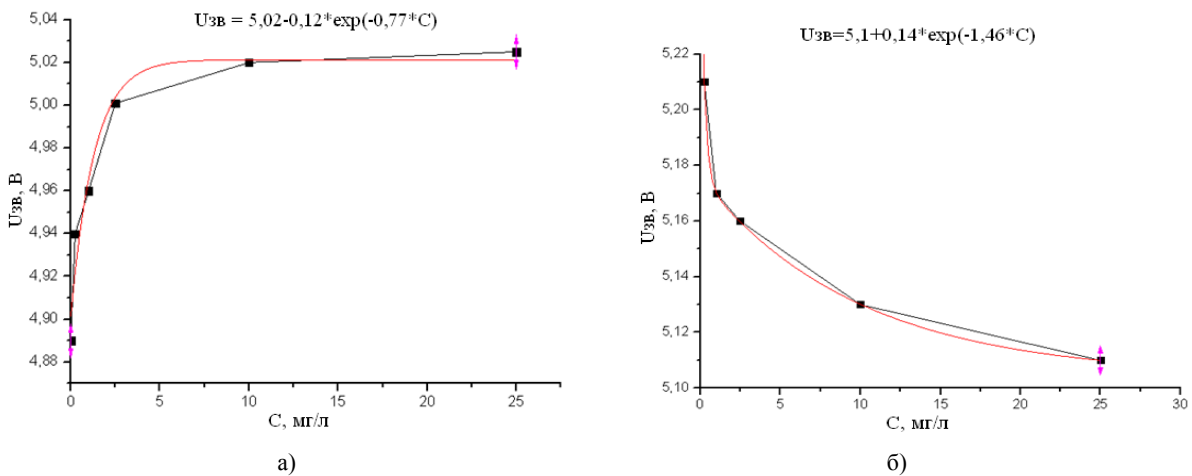


Рис. 5. Залежність напруги на затворі від концентрації СРБ для сенсора: а — без меланіну; б — з меланіном

Чутливість сенсора для обох зразків визначається крутизною характеристики функціональної залежності напруги від концентрації ( $U_{зв} = f(C)$ ):

$$\alpha(U_{cv} = 3\text{В}) = \frac{dU_{зв}}{dC}, \quad \text{якщо } U_{зв} = 0 \text{ В.} \quad (2)$$

Використовуючи експоненційну апроксимацію кривої  $U_{зв} = f(C)$  для експерименту без меланіну, отримано залежність  $U_{зв} = 5,02 + 0,12 \cdot \exp(-0,77C)$ , та для випадку з меланіном:  $U_{зв} = 5,1 + 0,14 \cdot \exp(-1,46C)$ . З аналітичних виразів обчисленні значення чутливості, які становили 92 мВ/(мг/л), та 204,4 мВ/(мг/л), відповідно.

З отриманих результатів можна зробити припущення, що шар меланіну підвищує чутливість сенсора на основі ІСПТ майже у 2,2 рази. Тобто меланін сприяє адсорбції більшої кількості стрептавідину, а отже й антитіл з антигеном на робочій поверхні ІСПТ.

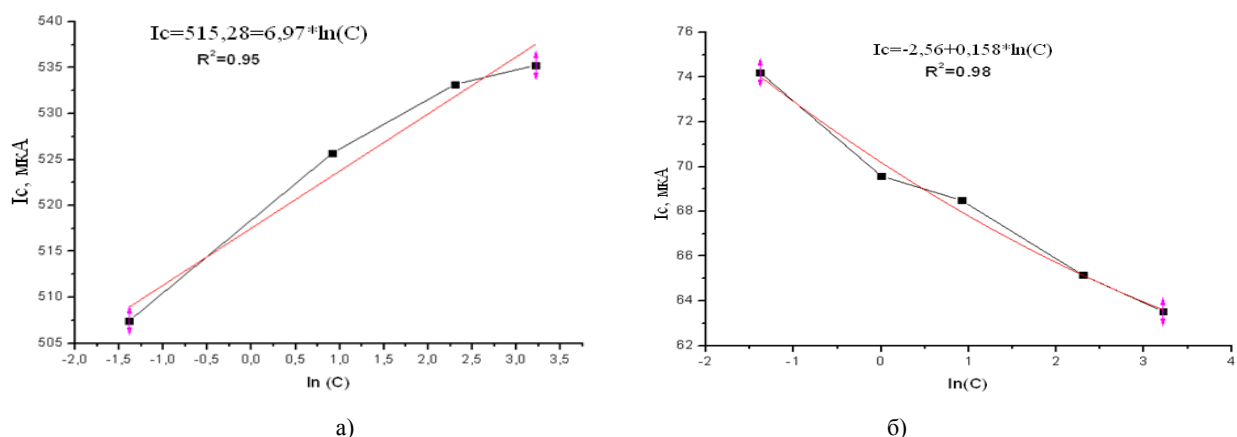


Рис. 6. Відношення сили струму сенсора до логарифму концентрації для зразка: а — без меланіну; б — з меланіном

На рис. 6 показана лінійна кореляція між логарифмом концентрації у діапазоні від 0,25 мг/л до 25 мг/л. В обох випадках коефіцієнт кореляції ( $R^2$ ) цих кривих близький до одиниці. Тому ми вважаємо, що розроблений сенсор можна використовувати для оцінювання концентрації СРБ, шляхом вимірювання вихідного струму в каналі ІСПТ за різних концентрацій антигену [7].

### Висновки

Запропоновано нову структуру сенсора на основі ІСПТ для детектування СРБ в двох модифікаціях: 1 — з додатковим буферним шаром меланіну, 2 — без нього. Сенсор може працювати в більшому діапазоні концентрацій, ніж аналогічні сенсори, запропоновані раніше [9]. Чутливість запропонованих структур сенсорів для модифікації 1, 2 становить 92 мВ/(мг/л) та 204,4 мВ/(мг/л), відповідно. Робоча (чутлива) поверхня сенсора із запропонованою системою шарів характеризується розгалуженою поверхнею, яка сприяє адсорбції більшої кількості антигену на поверхні. Показано, що шар меланіну підвищує чутливість сенсора на основі ІСПТ майже у 2,2 рази. Тобто меланін сприяє адсорбції більшої кількості стрептавідину, а отже й антигену з антигеном на робочій поверхні ІСПТ.

У результаті проведених досліджень показано, що сенсор з додатковим шаром меланіну має вищу чутливість, хоча і вимагає нанесення додаткового шару.

Отримані значення чутливості для обох модифікацій структур сенсорів дають можливість діагностувати запалення і хвороби людини за критичних значень СРБ, що пов'язано з діагностикою низки запалень і хвороб людини. Запропонований сенсор простий, у виготовленні має достатньо технологічну структуру для тиражування і широкого використання для виявлення маркерів запальних процесів на початкових етапах їхнього виникнення.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] E. Prestegard, "The future of point-of-care testing using C-reactive protein – ideal tool for diagnosis, prognosis and therapy management," *Businessbriefing: European endocrine review*, 2006, pp. 1-4.
- [2] C. H. Selfand, and D. B. Cook, "Advances in immunoassay technology", vol. 7, no. 1, pp. 60-65, 1996.
- [3] J. B. Aguiara Francisco, et. al., "C-reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use," *REV ASSOC MED BRAS*. 2013; 59 (1), pp. 85-92.
- [4] C. T. Limand, and Y. Zhang, "Bead-based microfluidic immunoassays: the extgeneration," *Biosens Bioelectron*, 2007, Feb 15; 22(7), pp. 197-204.
- [5] Y. H. Mattheward, and Ho C. S. Tangaand, "One-step immunoassay of C-reactive protein using droplet microfluidics," *Lab Chip*, 16, pp. 4359, 2016.
- [6] K. R. Katikireddy, and F. O'Sullivan, "Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis," *Methods Mol Biol*, 2011, pp 784:155-67.
- [7] C.-L. Lin, Y.-W. Kang, K.-W. Chang, W.-H. Chang, Y.-L. Wangandand, and G.-B. Lee, "An integrated microfluidic system using field-effect transistors for CRP detection," in *28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, 18-22 Jan, 2015.
- [8] H. C. Longuet-Higgins, "On the origin of the free radical property of melanins," *Arch Biochem Biophys*, Feb, 86:231-2, 1960.
- [9] W.-C. Kao, et. al., "Detection of C-reactive protein on an integrated microfluidic system by utilizing field-effect transistors and aptamers," *Biomicrofluidic*, no. 11, 2017.

Рекомендована кафедрою біомедичної інженерії ВНТУ

**Кутова Оксана Юрїївна** — асистент кафедри мікроелектроніки, e-mail: oksana03fel@gmail.com ;  
**Душейко Михайло Григорович** — провідний інженер науково-дослідної лабораторії напівпровідників кафедри мікроелектроніки;  
**Тимофєєв Володимир Іванович** — д-р техн. наук, професор, завідувач кафедри електронної інженерії. Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського», Київ;  
**Семененко Микола Олександрович** — канд. фіз.-мат. наук, старший наук. співробітник лабораторії. фізичних основ електронних напівпровідникових мікро- і нанотехнологій. Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ;  
**Столяр Любов Анатоліївна** — виконавчий директор ТОВ «УкрГентех», Київ

**O. Yu. Kutova**<sup>1</sup>  
**M. H. Dusheiko**<sup>1</sup>  
**M. O. Semenko**<sup>2</sup>  
**L. A. Stoliar**<sup>3</sup>  
**V. I. Timofiev**<sup>1</sup>

## Influence of Eddition Buffer Layer on CRP Sensor Sensitivity Based on ISFET

<sup>1</sup>National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”;

<sup>2</sup> V. E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics NAS of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup>UkrGenTech, Ltd, Kyiv

*The properties of sensor structure based on ion selectivity field effect transistor for electrical detection of C-reactive protein (CRP) were described and investigated in this paper. This protein is an acute phase biomarker that allows identification of inflammation in human body and also the CRP blood level is known to be associated with probability of cardio-vascular diseases. The physico-technological and topological characteristics of sensor based on ISFET with CeO<sub>2</sub> gate dielectric were studied and described in this paper. Cerium dioxide is a promising material for utilization as a gate oxide for FET fabrication and has a number of advantages compared to SiO<sub>2</sub>. In particular, it characterized by higher density of surface sensitive centers, better dielectric structure isolation, less current leakage through the dielectric, higher thermal and chemical stability, biocompatibility, as well as effective immobilization of biochemical elements using membranes to create biosensors. Silicon and cerium materials also have close value softlattice constants, ensuring their better adhesion in the structure of the ISFET. The experimental characteristics for both modification of sensors with and without addition buffer layer (melanin) were compared. Surfaces of both structures are almost the same in optical microscope, except surface with melanin has more branched structure. Based on this it was assumed that more streptavidin can be deposited on the surface and, as a result, a greater number of pairs of antigen-antibodies as one of the main working reactions of the biosensors. According to the measurements, sensitivity for both types of sensors was determined and it was established that the sensor sensitivity without melanin was 92 mV/(mg/L), and with addition buffer layer — 204,4 mV/(mg/L). Therefore the additional layer of melanin increases the sensor sensitivity more than 2 folds and this type of sensor is valuable to detect inflammation in human body at the early stage and predict the probability to appear the cardiovascular diseases and also decrease the number of deaths.*

**Keywords:** biosensor, C-reactive protein, melanin, sensitivity.

**Kutova Oksana Yu.** — Assistant of the Chair of Microelectronics, e-mail: oksana03fel@gmail.com ;  
**Dusheiko Mykhailo H.** — Senior Engineer of Scientific Laboratory of Semiconductor of the Chair of Microelectronics;  
**Timofiev Volodymyr I.** — Dr. Sc. (Eng.), Professor, Head of the Chair of Electronic Engineering;  
**Semenenko Mykola O.** — Cand. Sc.(Ph.-Math.), Senior Research Assistant of the Laboratory of Physical Bases of Electron Semiconductor Micro- and Nanotechnologies;  
**Stoliar Liubov. A.** — CEO of “UkrGenTech”, Ltd

О. Ю. Кутова<sup>1</sup>  
М. Г. Душейко<sup>1</sup>  
М. О. Семененко<sup>2</sup>  
Л. А. Столяр<sup>3</sup>  
В. І. Тимофеев<sup>1</sup>

## Влияние дополнительного буферного слоя на чувствительность сенсора СРБ на базе ИСПТ

<sup>1</sup>Национальный технический университет Украины

«Киевский политехнический институт им. Игоря Сикорского»;

<sup>2</sup>Институт физики полупроводников им. В.Е. Лашкарьова НАН Украины, Киев;

<sup>3</sup>ООО «Укрентех», Киев

Предложен и исследован сенсор на основе ион-селективного полевого транзистора (ИСПТ) для электронного детектирования С-реактивного белка (СРБ). СРБ является маркером выявления воспалительных процессов в организме, а также позволяет прогнозировать вероятность возникновения сердечнососудистых заболеваний. Описаны физико-технологические и топологические особенности предлагаемого сенсора на основе ИСПТ с подзатворным диэлектриком  $\text{SeO}_2$ . Двуокись церия является перспективным материалом для использования в качестве подзатворного диэлектрика для МДП-транзисторов и имеет ряд преимуществ по сравнению с пленками двуоксида кремния, широко используемого при изготовлении ИСПТ. В частности, большую плотность поверхностных чувствительных центров, обеспечивает лучшую диэлектрическую изоляцию структуры, меньший ток потерь через диэлектрик, высокую термическую и химическую стабильность, биосовместимость, а также эффективную иммобилизацию биохимических элементов с применением мембран при создании биосенсоров. Это объясняется тем, что постоянные решетки кремния и оксида церия близки по значению, что обеспечивает низкую плотность поверхностных состояний на границе раздела диэлектрик-полупроводник. Проведен сравнительный анализ экспериментальных характеристик сенсора без и с использованием дополнительного буферного слоя (меланина). Изображения обеих поверхностей, полученные с помощью оптического микроскопа, почти не отличаются, за исключением того, что поверхность с меланином имеет более развитую структуру. На основе этого было сделано предположение о возможности оседания большего количества стрептавидина на поверхность и как результат — большего количества образования пар антиген-антитело, как одной из основных реакций на которых базируется работа биосенсоров. По результатам измерений были определены чувствительность обеих структур сенсоров и установлено, что чувствительность сенсора без дополнительного слоя составляет 92 мВ/(мг/л), а с меланином 204,4 мВ/(мг/л). Таким образом, слой меланина повышает чувствительность сенсора более чем в 2 раза, а разработанный сенсор может эффективно применяться для выявления воспаления в организме человека на ранних стадиях и для анализа риска возникновения сердечнососудистых заболеваний, уменьшая количество смертельных случаев.

**Ключевые слова:** биосенсор, С-реактивный белок, меланин, чувствительность.

**Кутова Оксана Юрьевна** — ассистент кафедры микроэлектроники, e-mail: oksana03fel@gmail.com ;

**Душейко Михаил Григорьевич** — ведущий инженер научно-исследовательской лаборатории полупроводников кафедры микроэлектроники;

**Тимофеев Владимир Иванович** — д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой электронной инженерии;

**Семененко Николай Александрович** — канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории физических основ электронных полупроводниковых микро- и нанотехнологий;

**Столяр Любовь Анатольевна** — исполнительный директор