

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА  
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

На правах рукопису

БУБРЯК Ольга Андріївна

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ІММОВІЛІЗОВАНОЇ УРЕАЗИ  
ТА СТВОРЕННЯ НА ЇЇ ОСНОВІ БІОСЕНСОРА З МЕТОЮ  
ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00801443 (K)

ДБ-29.014  
Інститут молекулярної біології і

Науковий керівник: доктор біологічних наук М.Ф. Стародуб

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук М.П. Дмитренко,  
кандидат хімічних наук С.В. Михаловський

Провідна установа: Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
АН України

Захист відбудеться "31" січня 1994 р. о 14 годині  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в Інсти-  
туті біохімії ім.О.В.Палладіна АН України за адресою: 252601,  
м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту  
біохімії ім.О.В.Палладіна АН України.

Автореферат розісланий "25" грудня 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук

О.В.Кірсенко

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Імобілізовані ферменти знаходять широке застосування в різних галузях діяльності людини, а саме в медицині, харчовій промисловості, біотехнології. Неможливо говорити про узагальнений спосіб імобілізації ферментів: для кожного з них необхідно підбирати свій специфічний підхід, виходячи з конкретних задач та цілей використання ферменту. Вільш того, виникає потреба різнобічного дослідження властивостей як вільного так і імобілізованого ферменту, вибору умов збереження його активності в імобілізованому стані з метою оптимізації функціонування ферменту на протязі певного проміжку часу та в різних біологічних середовищах.

Одним з ферментів, що найбільш широко вивчається з метою практичного застосування є уреаза. Основним напрямком її застосування є визначення сечовини у розчинах та біологічних рідинах (зокрема в крові). Для цього фермент імобілізують на різних носіях, або на фізичних поверхнях пристроїв, що рееструють кінцеві продукти ферментативної реакції. Такими пристроями являються, зокрема, біосенсиори.

Великий інтерес, який проявляється до біосенсорів протягом останніх десяти років, зумовлений їх певними перевагами в порівнянні з традиційними методами хімічного аналізу: високою чутливістю та специфічністю при відносній дешевизні та простоті використання.

На початок наших досліджень роботи по створенню біосенсорів на основі уреазі проводились рядом вчених /Kulys et al. 1986; Narinesing et al., 1989; Ozakai et al., 1988; Przybyt, Sugier, 1990/ але вони акцентували увагу на пристроях, що базуються на використанні різних конструкцій макроелектродів. Виходячи з переваг польових транзисторів перед макроелектродами щодо чутливості та технологічності виготовлення, ми зосередились на розробці уреазних сенсорів саме на їх основі.

На сьогоднішній день створено декілька варіантів уреазного біосенсору на сечовину на основі електродів, напівпровідникових транзисторів та оптичних волокон /Karube et al. 1986; Anzai et al. 1985, 1986, 1987; Nakamoto et al., 1988; Van der Shoot, 1988; Gardies et al., 1990/. Але існують тільки поодинокі приклади промислово розроблених уреазних сенсорів такі, як сенсор фірми Owens-Illinois (Kimble) з використанням імобілізованої уреазі та

аміачного електроду. Привертає увагу також те, що тільки в двох роботах /Shiono et al., 1986; Anzai et al., 1987/ повідомлялося про проведення визначення концентрації сечовини в крові за допомогою уреазних сенсорів на основі польських транзисторів. Це, можливо, зумовлено певними труднощами проведення вимірів в крові. Крім того, існує ряд проблем, пов'язаних як з конструкцією ПТ, так і з іммобілізацією біологічного матеріалу на їх поверхні. Весь комплекс проблем набуває особливого значення, якщо мати на увазі не тільки створення лабораторного прототипу біосенсора як такого, але й багатопланове дослідження з метою оцінки можливості та ефективності його застосування у клінічній практиці.

Мета та задачі дослідження. Головною метою роботи є іммобілізація уреазі різними методами на поверхні напівпровідникових пристроїв, дослідження властивостей та умов збереження активності ферменту і створення на його основі лабораторного прототипу біосенсора для визначення сечовини в сироватці крові.

Виходячи з мети роботи, були сформульовані наступні задачі:

1. Здійснити різними методами іммобілізацію уреазі на поверхні напівпровідникових структур та підібрати найбільш оптимальний метод для нанесення ферменту на рН-ПТ.

2. Вивчити особливості зміни властивостей уреазі при її іммобілізації вибраним методом.

3. Різномірно охарактеризувати відгук біосенсору при вимірюванні концентрації сечовини в модельних розчинах та безпосередньо в сироватці крові.

4. Визначити рівень кореляційної залежності між величинами, отриманими за допомогою біосенсору та фенол-гіпохлоритного методу.

5. Вивчити можливості максимального збереження активності уреазі при іммобілізації та в іммобілізованому стані з метою стабілізації роботи сенсору.

Наукова новизна роботи.

В роботі вперше проведені дослідження по вибору оптимального способу формування ферментної мембрани з іммобілізованою уреазою на поверхні напівпровідникових структур. Показано, що включення уреазі в мембрану шляхом полімеризації її з ВСА за допомогою парів ГА більш технологічне, та надає можливість у значно більшій мірі уникати інактивації ферменту порівнянно з мембраною на основі ПААГ. Підібрані оптимальні умови формування мембрани на основі ВСА. Досліджено властивості іммобілізованої даним методом уреазі.

Розроблено лабораторний прототип уреазного біосенсору на ос-

нові рН-чутливого польового транзистору та рiанобiчно дослiджено його електрохiмiчнi властивостi. Вперше пiдбранi оптимальнi умови визначення за допомогою ензимосенсору концентрацiї сечовини в модельних розчинах, наближених за властивостями до сироватки кровi, та безпосередньо в пiй. Проведено порiвняння результатiв тестування вiстуну сечовини в сироватцi кровi, одержаних за допомогою гiпохлоритного методу та ензимосенсору, а також визначенi основнi переваги останнього в планi практичного використання.

#### Практична цiннiсть роботи.

Створена дiюча модель (прототип) ензимосенсору для експресно-го визначення концентрацiї сечовини в сироватцi кровi (90% вiдгуку цього сенсору реалiзується на протязi 2 хв). Строк роботи датчика ензимосенсора близько 20 вимiрювань. Наведенi характеристики вказують на перспективнiсть розробленого прототипу уреазного бiосенсора для практичної медицини. Вiн може бути основою при розробцi та налагодженнi промислового випуску вимiрювальних приладiв такого типу для бiохiмiчної дiагностики.

Апробацiя роботи Результати дослiджень доповiдалися на V науковiй конференцiї молодих вчених (Ужгород, 1990), на Республiканськiй науково-технiчнiй конференцiї "Новые возможности современного приборостроения" (Ворзель, 1991), на II Всесоюзному симпозиумi "Инженерная энзимология" (Москва, 1991), на Мiжнародному симпозиумi "Biosensor symposium" (Enschede, 1991), на II Свiтовому конгресi "Second World Congress on Biosensors" (Женева, 1992).

Публiкацiї. Основнi результати роботи опублiкованi в 12 наукових роботах.

Структура та об'єм роботи. Дисертацiя складається з вступу, огляду лiтератури та експериментальної частини, яка вiключає опис матерiалiв та методiв дослiдження, викладу результатiв роботи, та їх обговорення (у 3 роздiлах), висновкiв, а також списку лiтератури, який вiключає 84 публiкацiї.

#### Скорочення, що вживаються в роботi.

- ГА - глутаровий альдегiд.
- БСА - бичачий сиворотковий альбумiн.
- ЕДТА - етилендiамiнтетраацетат.
- ПТ - польовий транзистор
- ПААГ - полiакриламiдний гелъ
- АФ - активнiсть ферменту вiд максимальної в експериментi, %
- А - амплiтуда сигналу бiосенсора

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ІММОБІЛІЗАЦІЯ УРЕАЗИ ТА ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ  
ІММОБІЛІЗОВАНОГО ФЕРМЕНТУ

Розробка підходів іммобілізації уреазы у складі біомембран.

Для іммобілізації уреазы у складі ПААГ була випробувана можливість ковалентного зв'язування її одночасно з полімеризацією гелю як хімічним, так і фотохімічним методами. Виявилось, що полімеризація геля досягається тільки при концентрації уреазы не більше 30 мг/мл при незначному співвідношенні величин площі поверхні, яку займає гель, та його об'єму. Це не дає змоги отримувати тонкі мембрани з високою питомою активністю ферменту, особливо внаслідок інактивуючого впливу вихідних компонентів і продуктів реакції полімеризації ПААГ на фермент. Таким чином, подальші дослідження були спрямовані на формування білкової мембрани шляхом ковалентного зв'язування ферменту з ВСА трьома способами: а) розчин ГА вносили у попередньо приготовану суміш уреазы та альбуміну (найбільш поширений метод); б) попередньо висушену на поверхні кремнієвих структур суміш ферменту та альбуміну у вигляді тонкої плівки обробляли розчином ГА; в) тонкий шар суміші альбуміну та ферменту на поверхні кремнієвих пластин піддавали дії парів ГА у вологій камері протягом різного часу, а потім отриману мембрану підсушували на повітрі.

При вимірюванні залишкової ферментативної активності виявилось, що в першому і другому випадках спостерігається значне зниження активності ферменту, і, навіть, цілковита його інактивація. У певній мірі цей процес відбувається і при формуванні ферментної мембрани третім способом, але в останньому випадку все ж спостерігається збереження до 20% вихідної активності ферменту. Тому надалі нами були підібрані оптимальні умови іммобілізації уреазы цим способом. Критеріями відбору різних досліджуваних варіантів були адгезія мембрани до поверхні напівпровідникових структур та величина залишкової ферментативної активності. Встановлено, що для утворення білкової мембрани та збереження при іммобілізації максимального рівня залишкової ферментативної активності, найбільш придатна суміш, що вміщує альбумін та уреазу у співвідношенні 3:1, а оптимальний час експозиції кремнієвих пластин в парах ГА становить 30 хв. За таких умов зберігається до 20 % вихідної активності ферменту в мембрані. З іншого боку, при однаковому терміні експозиції

в парах ГА питома активність уреазі максимальна при співвідношенні БСА:уреаза 1:1. Таку суміш, об'ємом не більше 0,5 мл, наносили на область затвору польового транзистору і, тоді 30 хвилинної інкубації в парах ГА було достатньо для полімерізації мембрани. Тому в подальшому перевага була надана співвідношенню компонентів 1:1, як такому, що забезпечує максимальне збереження питомої активності уреазі, при її іммобілізації в парах ГА на протязі понад 30 хв.

#### Вивчення властивостей іммобілізованої уреазі

Нами були охарактеризовані оптимальні умови функціонування іммобілізованої уреазі, включаючи залежність активності ферменту від рН, йонної сили, буферної ємкості середовища, а також її стійкість до термоінактивації.

На рис.1 наведена залежність активності вільного (крива 1) та іммобілізованого (криві 2,3) ферменту від рН інкубаційного середовища. Оптимум рН для нативної уреазі у 100 мМ фосфатному буфері знаходиться в межах 7-7,5. Для іммобілізованого ферменту він більш вузький, і у випадку визначення активності уреазі у 100 мМ буфері становить 7,5. При використанні 1 мМ буфера оптимум рН іммобілізованої уреазі зсувається в кислий діапазон на 1-1,5 одиниці. Такий ефект пов'язаний, можливо, з тим, що у розчинах з низькою буферною ємкістю в результаті накопичення іонів амонію локальне залужнення не компенсується, тому фермент фактично функціонує при більш високих значеннях рН, ніж рН буферного розчину, що використовується.

На рис. 2 наведена залежність активності вільного (крива 1) та іммобілізованого (крива 2) ферменту від буферної ємкості середовища інкубації при рН фосфатного буфера 7,5. При зміні концентрації буфера від 0 до 5 мМ активність ферменту дещо зростає, що, певно, пов'язано із стабілізацією структури ферменту. Подальше зростання молярності буфера викликає зниження рівню активності уреазі, що може бути зумовлене зміною проникності мембрани для субстрату за рахунок збільшення йонної сили.

З метою перевірки цього припущення, нами була вивчена залежність активності вільної (рис. 3, крива 1) та іммобілізованої (рис. 3, крива 2,3) уреазі від йонної сили інкубаційного середовища. Виявилось, що активність уреазі зникається із зростанням концентрації NaCl. Це, можливо, є наслідком екранування заряджених груп активного центру ферменту та зменшення проникності мембрани для субстрату. Останнє припущення частково підтверджується результатами експериментів по вивченню набрякання мембрани при різній йонній силі. Ступінь набрякання альбумінової мембрани, сформо-

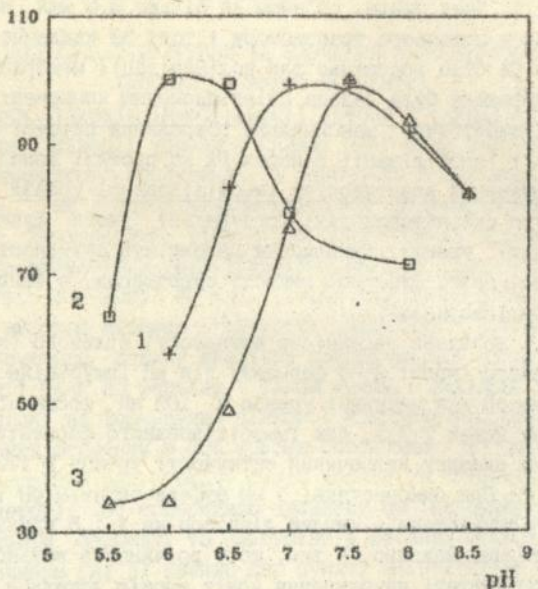


Рис. 1. Залежність активності вільної (крива 1) та іммобілізованої уреази (криві 2,3) від рН інкубаційного середовища: крива 1 - 100 мМ калій-фосфатний буфер, криві 2,3 - 1 мМ та 100 мМ калій-фосфатний буфер відповідно.

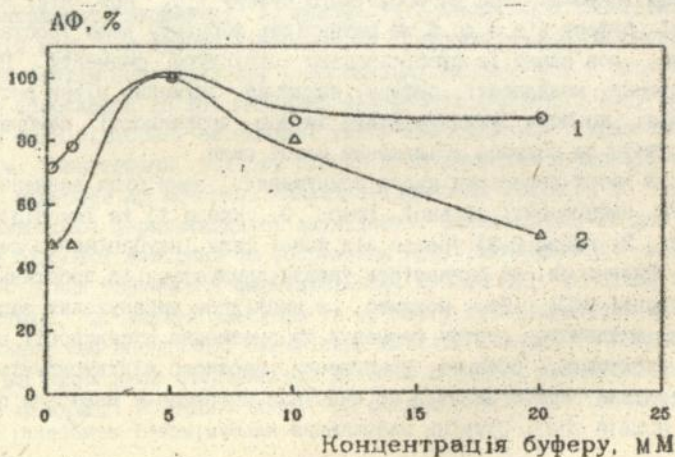


Рис. 2. Залежність активності вільної (крива 1) та іммобілізованої (крива 2) уреази від концентрації калій-фосфатного буферу.

ваної за допомогою ГА, залежить від величини йоної сили: чим більше йона сила розчину, тим менше ступінь набрякання мембрани. Необхідно відмітити, що ступінь набрякання такої мембрани не перевищує 35 відсотків.

Стабільність іммобілізованої уреазы характеризували по кінетиці термоінактивації ферменту та циклічності його роботи. Іммобілізована уреаза більш термостабільна, порівняно з розчинним ферментом при всіх досліджених значеннях рН буферного розчину. Причому найбільшу різницю зареєстровано при значення рН 7,0, коли після прогрівання мембрани на потязі 30 хв при 65°C зберігається до 80% вихідної активності ферменту (на відміну від вільного ферменту, активність якого при тих самих умовах зберігається лише на 40 %). Іммобілізований фермент витримує до 8 циклів роботи (по 10 хв кожний) без втрати активності. Велике практичне значення при створенні ферментного сенсору має визначення  $K_m$  для іммобілізованих ферментів, оскільки це дозволяє оцінювати можливі межі визначення концентрації субстратів цих ферментів. Для уреазы, іммобілізованої в альбуміновій мембрані, величина  $K_m$  за сечовиною становить 2,0 мМ при 20°C та рН 7,0. Визначена при тих же умовах величина  $K_m$  для розчинного ферменту становила 3,3 мМ.

#### СТВОРЕННЯ УРЕАЗНОГО СЕНСОРУ НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ

##### Вивчення електрохімічних властивостей уреазного біосенсора

Типовий вигляд відгуку біосенсору на певну концентрацію сечовини в залежності від часу представлений на рис. 4. Базова лінія отримана за відсутності субстрату. Після внесення сечовини максимальна величина відгуку досягалась впродовж 1-3 хв. Коливання часу, протягом якого досягається максимальна величина відгуку, зумовлені, очевидно, різною товщиною мембран.

Максимальна величина відгуку біосенсора та швидкості його наростання спостерігається при рН 7,0-7,5, що узгоджується з попередніми даними по колориметричному визначенню залежності активності іммобілізованої уреазы від рН буферу. Причому, необхідно зазначити, що крива максимальної швидкості наростання відгуку в залежності від рН повністю відповідає такій самій залежності для нативної уреазы. Щодо залежності максимальної величини відгуку від рН, спостерігається більш широкий оптимум, зміщений в лужну область. Цей факт можна пояснити тим, що, з одного боку, уреазы має високу

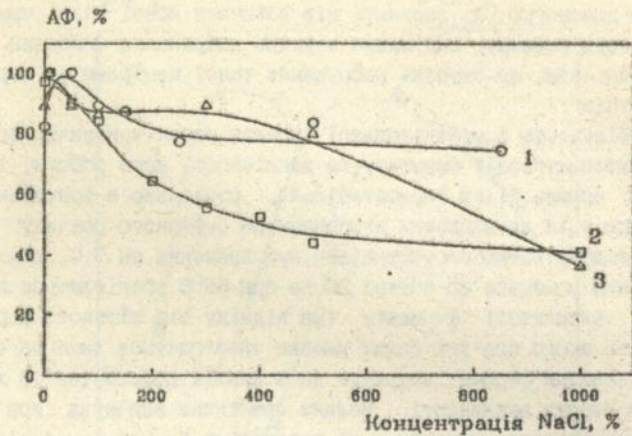


Рис. 3. Залежність активності вільної (крива 1) та іммобілізованої (криві 2,3) уреази від концентрації NaCl: криві 1,2 - 20 мМ калій-фосфатний буфер, крива 3 - 1 мМ калій-фосфатний буфер.

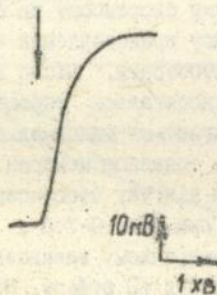


Рис. 4. Вигляд відгуку біосенсору на сечовину (0,4) мМ у 1 мМ іоно-фатному буфері, pH 7,5. Момент внесення субстрату позначен стрілкою.

активність при pH 8,0, а з другого боку, буферна ємність калій-фосфатного буферу при такому значенні pH вже незначна (для калій-фосфатного буферу  $pK = 7,2$ ). Тобто, якщо при pH 8,0 власна активність уреазини дещо знижується в порівнянні з активністю при pH 7,0-7,5, все рівно ми можемо мати аналогічну чи навіть більшу величину відгуку біосенсору за рахунок зменшення буферної ємності розчину. Крім того, такий широкий pH-оптимум може бути зумовлений наявністю надлишку фермента на поверхні польового транзистору.

З метою перевірки цього припущення вивчали залежність величини відгуку біосенсору від температури. Зміна температури досліджуваного розчину від 15° до 30°C практично не впливала на величину відгуку біосенсору, тоді як активність нативного ферменту за таких умов суттєво зростала. Ці результати свідчать про існування надлишку ферменту на поверхні польового транзистору, тому величина відгуку біосенсору визначається тільки концентрацією субстрату в досліджуваному зразку.

Із зростанням буферної ємності розчину величина відгуку біосенсору значно знижується (Рис. 5). При цьому межі вимірюваних концентрацій сечовини зсуваються в бік їх збільшення. Так, у 1 мМ фосфатному буфері область пропорційної залежності величини сигналу біосенсору від концентрації сечовини складала від 0,05 до 0,5 мМ, а в 5 та 10 мМ буфері - від 0,1 до 1,0 мМ та від 0,25 до 1,5 мМ відповідно. Тобто, чутливість сенсору залежить від буферної ємності досліджуваного зразку, що необхідно враховувати при вимірюванні концентрації сечовини в біологічних рідинах.

Для біологічних рідин характерними є високі концентрації різних солей, тому важливо з'ясувати, чи залежить хід калібровочної кривої від наявності в досліджуваному зразку значної концентрації NaCl (основна сіль, концентрація в сироватці крові близько 150 мМ). Виявилось, що підвищення концентрації солі від 0 до 200 мМ призводить до зниження величини сигналу приблизно на 50% (Рис. 6). При подальшому зростанні концентрації солі до 400 мМ величина відгуку практично не змінюється. Таким чином, при визначенні рівню сечовини в біологічних рідинах необхідно у вихідний буфер додавати NaCl в концентрації не нижче 200 мМ. Враховуючи те, що в сироватці крові концентрація NaCl становить 150 мМ, при внесенні зразку у вимірювальну комірку концентрація розчину буде визначатися концентрацією солі буферу. Таким чином, можливі коливання цього параметру для зразку сироватки не будуть впливати на величину сигналу біосенсору

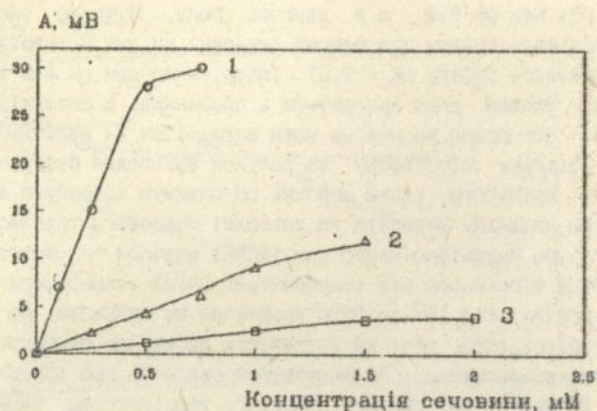


Рис. 5. Залежність величини відгуку біосенсора на сечовину від концентрації буферу: 1, 2, 3 - 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ калій-фосфатний буфер відповідно.

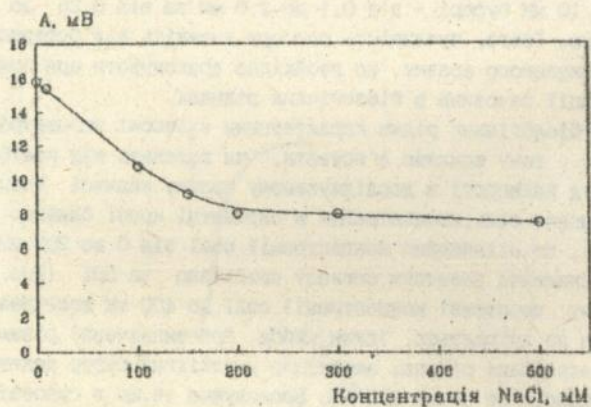


Рис. 6. Залежність амплітуди відгуку сенсора на 1 мМ сечовину від концентрації NaCl.

та вносити похибку у визначення концентрації сечовини.

Нами була визначена операційна стабільність роботи біосенсору. Ввеличина відгуку на 1,5 мМ сечовину зменшувалася поступово, і за два тижні роботи сенсору становла 70% вихідної величини. Щодобово проводилося 10 - 12 вимірів. Розбіжність між вимірами не перевищувала 10 %. Один датчик витримує до 20 вимірів без падіння величини сигналу і до 130 вимірів при падінні сигналу не більше 30 відсотків.

#### Визначення рівню сечовини в сироватці крові

Виявлено, що внесення розведеної в 25 разів сироватки в розчин, що аналізується, змінює нахил калібрівочної кривої (рис.7). При такому розведенні концентрація сечовини не виходить за межі чутливості сенсору (0,1 мМ сечовини). За врахуванням цього ефекту була одержана калібрівочна крива та визначено концентрації сечовини у сироватці крові лабораторних тварин (табл. 1). Паралельно концентрація сечовини визначалась фенол-гіпохлоритним методом. Розбіжність у значеннях не перевищувала 10 відсотків.

Таблиця 1. Порівняння результатів визначення концентрації сечовини в сироватці крові лабораторних тварин, отриманих фенол-гіпохлоритним методом та з допомогою уреазного біосенсору.

Концентрація сечовини, мМ (фенол-гіпохлоритний м-д)	Концентрація сечовини, мМ (сенсор)	Відхилення, % $\frac{(A-B) \times 100}{A}$
A	B	A
Сироватка крові пацюків		
6,75	6,25	7,4
9,00	8,75	2,8
Сироватка крові кроликів		
13,75	14,40	4,7
16,25	16,00	1,5
13,25	14,40	8,7
13,75	14,40	4,7

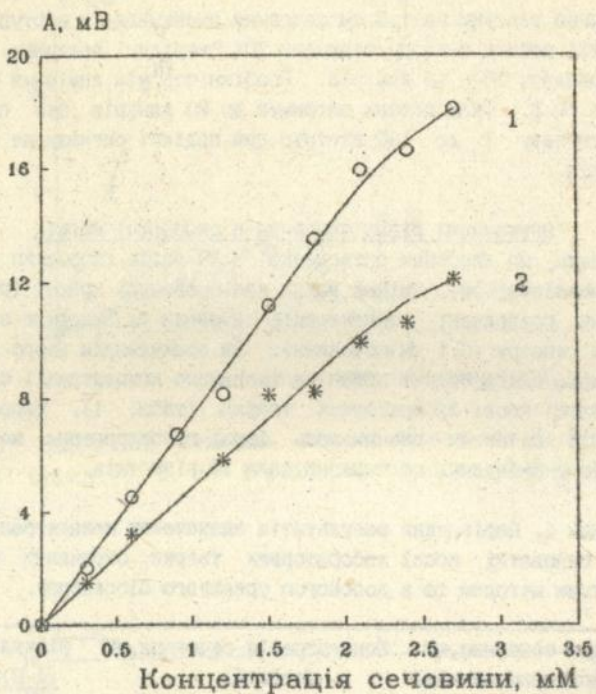


Рис. 7. Калібровочні криві уреазного біосенсора у 10 мМ калій-фосфатному буфері для визначення сечовини за відсутності сироватки (крива 1) та при наявності сироватки 25-кратного розведення (крива 2).

## ПОШУК ШЛЯХІВ СТАБІЛІЗАЦІЇ РОБОТИ УРЕАЗНОГО СЕНСОРА

### Стабілізація активності уреазы при іммобілізації

З метою оцінки шляхів стабілізації активності ферменту в процесі іммобілізації вивчали можливість захисту активного центру ферменту під час формування мембрани в присутності субстратів (сечовини та формаміду) та стеричного аналога субстрату - тіосечовини.

Усі сполуки вносили у середовище для іммобілізації в 4-х кратному молярному надлишку по відношенню до ферменту. Кінцева концентрація субстрата становила 1 мМ. Виявилось, що при наявності сечовини в середовищі іммобілізації, навіть при збільшенні часу експозиції мембрани в парах ГА до 1 год виникають проблеми з її полімеризацією. Можливо, це являється результатом локального залуження середовища біля молекул ферменту в процесі розщеплення сечовини уреазою. Така зміна рН може негативно впливати на процес полімеризації. В той же час, при наявності в середовищі іммобілізації формаміду, що розщеплюється уреазою з набагато меншою швидкістю ( $K_m = 1,06 \text{ мМ}$ ), активність іммобілізованої уреазы на 25% вища, ніж у варіантах без формаміду. Можливо, зв'язуючись з активним центром, формамід захищає функціонально важливі групи активного центру від взаємодії з ГА, оскільки субстрат-ферментний комплекс в даному випадку розпадається набагато повільніше, ніж в випадку з сечовиною. Хоча, в той же час, тіосечовина не виявляє протекторної дії на активність уреазы, а навпаки інгібує її. Ці закономірності зберігаються при збільшенні часу обробки мембрани парами ГА до 2 годин.

Щоб скоротити час процесу іммобілізації уреазы, і тим самим зменшити можливий вплив продуктів реакції та зміни рН на процес полімеризації, була проведена спроба її формування з використанням 2,5% розчину ГА. Однак, хоча в такому випадку час полімеризації скорочується до кількох хвилин, були отримані результати, подібні до попередніх. Присутність формаміду в середовищі іммобілізації збільшує активність уреазы, присутність тіосечовини та сечовини пригнічують активність ферменту в процесі іммобілізації.

Відомо, що як стабілізатори ферментів використовують також сахарозу та гліцерин. Тому ми вважали доцільним перевірити вплив цих сполук на збереження активності уреазы при іммобілізації. Максимальна активність іммобілізованої уреазы спостерігалася при наявності 5% гліцерину в середовищі і часу експозиції в парах ГА 30

хв. Необхідно відмітити, що збільшення часу обробки парами ГА до 1 години практично не впливає на активність іммобілізованого ферменту. Збільшення концентрації гліцерину з 10 до 20% негативно впливає на процес формування мембран. Мембрана гірше полімеризується і в наслідок цього з неї вимивається фермент. Однак позитивним моментом є те, що гліцерин запобігає підсиханню розчину, нанесеного на поверхню, що необхідно для проникнення в неї парів ГА та самого процесу полімеризації.

Дослідження активності уреазы при іммобілізації в присутності сахарози показали, що її наявність в середовищі іммобілізації також підвищує залишкову активність уреазы в мембрані. Оптимальними концентраціями сахарози є 2,5% при 30 хв експозиції в парах ГА та 5% , якщо термін експозиції становить 1 год.

#### Стабілізація активності уреазы при зберіганні

Ще одним напрямком наших досліджень був пошук оптимальних умов зберігання ферментних мембран. При зберіганні іммобілізованого ферменту в буферних розчинах однією з основних причин падіння активності ферменту може бути бактеріальна деградація мембрани. Для пригнічення бактеріальної флори при зберіганні біомембрани в буфері використовували азид натрію. Як показали дослідження, азид натрію пригнічує активність уреазы на 30 % при концентрації 0,1 %, але в процесі відмивання мембрани від консерванта активність іммобілізованого ферменту практично відновлюється до вихідного рівня. Тому в подальших довгострокових експериментах ми використовували азид натрію як консервант і відмивали його при використанні сенсорного датчика.

В табл. 2 представлені результати досліджень активності іммобілізованої уреазы за різних умов зберігання. Максимальний ефект досягається при зберіганні іммобілізованого ферменту в буфері в присутності 1 мМ ЕДТА при 4°C. Уреаза зберігала 100% активності на протязі одного місяця. При зберіганні в інших умовах втрачається від 30 до 75 % активності ферменту.

Таблиця 2. Залежність залишкової уреазы (у відсотках від вихідної активності) при різних умовах зберігання

Умови зберігання імобілізованої уреазы	Термін зберігання, доба				
	0	9	11	17	29
20 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,4, 4°C	100	107	116	-	71
20 мМ калій-фосфатний буфер, 1 мМ ЗДТА, 4°C, рН 7,4	100	115	105	104	107
У сухому стані, 4°C	100	99	91	88	67
У сухому стані, 20°C	100	76	71	32	27

#### ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження по вибору оптимального способу формування ферментної мембрани біосенсору на основі імобілізованої уреазы. Показано, що включення уреазы в мембрану шляхом полімеризації ІІ з ВСА за допомогою парів ГА більш технологічне, та надає можливість у значно більшій мірі уникати інактивації ферменту порівняно з мембраною на основі ПААГ. Підібрані оптимальні умови формування мембрани на основі ВСА.

2. Досліджено властивості імобілізованої уреазы. Встановлено, що Km для вільної та імобілізованої уреазы близькі за значенням. Імобілізована уреазы більш термостабільна в порівнянні з вільним ферментом.

3. Створено лабораторний прототип уреазного біосенсору на основі рН-ІІТ, та вивчено його електрохімічні властивості: залежність величини сигналу від рН, йсної сили та концентрації буферу. Пі-

дібрані оптимальні умови визначення сечовини в модельних розчинах, наближених за властивостями до сироватки крові.

4. Визначено, що чутливість уреазного сенсору достатня для визначення концентрації сечовини в сироватці крові. Коефіцієнт кореляції між показниками сечовини в сироватці крові, що були визначені за допомогою уреазного біосенсора та гіпохлоритним методом, складає 0,98.

5. Показано, що один датчик витримує до 20 вимірів без падіння величини сигналу. Розбіжність між вимірами при відтворенні сигналу не перевищує 10 %.

6. Визначено вплив ЕДТА, гліцерину, сахарози, субстратів уреазы (сечовини, формаміду) та їх аналога тіосечовини на зберігання активності уреазы при іммобілізації в мембрані та при зберіганні ферментної мембрани за різних умов. Встановлено, що наявність в розчині сахарози, та особливо гліцерину, при формуванні ферментної мембрани більш ефективно запобігає інактивації уреазы, ніж присутність вказаних вище субстратів.

Основні положення дисертації опубліковані  
в роботах:

1. Стародуб Н.Ф., Сандровский А.К., Солдаткин А.П., Вубряк О.А., Ельская А.В., Самиба С.Е., Стриха В.И., Хусточка Л.Н., Шульга А.А. Мультибиосенсор на основе полевых транзисторов для определения глюкозы и мочевины // Всесоюзная конференция "Химические сенсоры": Тез. докл. - Ленинград, 1989. - ч.3. - С.259

2. Стародуб Н.Ф., Зайцев Б.Н., Хусточка Л.Н., Лазаренко А.В., Коломиец Л.Н., Вубряк О.А., Турковская Г.В., Ельская А.В. Интеграция биологического материала в электрохимические биосенсорные устройства // Всесоюзная конференция "Химические сенсоры": Тез. докл. - Ленинград, 1989. - ч.3. - С.213

3. Вубряк О.А., Лазаренко А.В., Хусточка Л.Н. Экспериментальные подходы формирования на поверхности кремниевых структур матрицы, биоселективной к мочеvine // V научная конференция молодых ученых: Тез. докл. - Ужгород, 1990. - С. 165.

4. Стародуб Н.Ф., Хусточка Л.Н., Лазаренко А.В., Вубряк О.А., Терентьев Ф.Г., Ельская А.В. Интеграция биологического материала в электрохимические биосенсорные устройства // Ж. аналит. химии - 1990. - 45, N 7. - С. 1432-1440.

5. Вубряк О.А., Хусточка Л.Н., Солдаткин А.П., Ельская А.В.

Формирование биомембраны для энзимосенсоров на основе полупроводниковых структур//Материалы 11 Всес.смп."Инженерная энзимология". - Москва.1991. - С.211-212.

6. Солдаткин А.П., Бубряк О.А., Стародуб Н.Ф., Ельская А.В. Использование ферментных биосенсоров на основе pH-чувствительных полевых транзисторов для анализа низкомолекулярных веществ// Республиканская научно-техническая конференция "Новые возможности современного медицинского приборостроения": Тез. докл. - Ворзель, 1991. - С. 85.

7. Бубряк О.А., Солдаткин А.П., Стародуб Н.Ф., Ельская А.В. Биосенсор для определения мочевины на основе pH-чувствительных полевых транзисторов//Республиканская научно-техническая конференция "Новые возможности современного медицинского приборостроения": Тез. докл. - Ворзель, 1991. - С. 86.

8. Starodub N.F., Bubryak O.A., Pavlenko L.N., Soldatkin A.P., Rachkov A.E., El'skaya A.V. Biomembrane formation for enzyme- and immunosensors: approaches and achievements // Biosensor symposium, Enschede, 1991, Abstr., P.48.

9. Бубряк О.А., Хусточка Л.Н., Солдаткин А.П., Стародуб Н.Ф. Исследование иммобилизации и свойств уреазы с целью создания биосенсора на основе полупроводниковых структур//Укр. биохим. журнал -1992.-64, N 1.- С. 66 - 71.

10. Shul'ga A.A., Strikha V.I., Patskovsky S.V., Dzydevich S.V., El'skaya A.V., Soldatkin A.P., Bubryak O.A. Thin-film Conductometric Biosensors for Glucose and Urea Determination// Proc. of the Second World Congress on Biosensors. - Geneva, Switzerland, 1992. - P. 45-48.

11. Бубряк О.А., Солдаткин А.П., Стародуб Н.Ф., Ельская А.В., Шульга А.А., Стриха В.И. Изучение оптимальных условий работы биосенсора на основе уреазы и pH-чувствительных полевых транзисторов. Определение мочевины в растворе// Укр. биохим. журнал. - 1993. - 65, N 1. - С.110-113.

12. Бубряк О.А., Солдаткин А.П., 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, N 3. С. 315-320.

О.Гу-

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

АВ 29.014

---

Підп. до друку 08.12.93 . Формат 60x84/16. Папір друк. Офс. друк.  
Ум. друк. арк. 0,93 . Ум. фарбо-відб. 0,93 . Обл.-вид. арк. 0,8  
Тираж 100 пр. Зам. 443 Безкоштовно.

---

Віддруковано в Інституті математики АН України  
252601 Київ 4, ІСП, вул. Терещенківська, 5.