

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В.ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ЖИЛЯК

Гліб Анатолійович

**РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ**

03. 00. 23 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1997

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (м. Київ).

Наукові керівники:

акад. НАН України,
доктор біологічних наук, проф.
ЄЛЬСЬКА Ганна Валентинівна,

канд. біологічних наук, ст. н. співр.
СОЛДАТКІН Олексій Петрович.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
проф. КУДІНОВ Станіслав Олександрович,

доктор фізико-математичних наук,
проф. ШИРШОВ Юрій Михайлович.

Провідна установа:

Національний університет
ім. Тараса Шевченка (м. Київ).

Захист дисертації відбудеться 23 червня 1997р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України за адресою:

252601, м.Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий 22 травня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Кирсенко О.В.

ЛІНБ України ім.В.Стефаніка



00752672 (Т)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Сьогодні проблеми охорони навколишнього середовища та створення умов для його відновлення екологічно оптимальним чином набули глобального характеру.

Переважна більшість екологічно небезпечних ситуацій обумовлена хімічним забрудненням атмосфери, води та ґрунту з несприятливими наслідками для людей, флори та фауни. Визначення джерел цих забруднень та встановлення контролю за ними передбачає постійний всеосяжний екоаналіз (моніторинг). Для здійснення тотального та селективного моніторингу необхідні принципово нові аналітичні системи, які спроможні, при низьких фінансових витратах, швидко і з потрібною точністю оцінювати стан довкілля. Такими пристроями можуть стати біосенсори, які активно розробляються у світі протягом двох останніх десятиліть.

В цій роботі, на прикладі конкретних електрохімічних систем, досліджено можливість використання ферментних електродів у мініатюрних технологічних автоматизованих датчиках, що мають високу чутливість і спроможні проводити, у реальному масштабі часу, аналіз токсичності води, забрудненої іонами важких металів.

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було створення лабораторних моделей електрохімічних біосенсорів на основі імобілізованих ферментів для аналізу іонів важких металів у водних розчинах.

Основним завданням роботи було:

1. Розробити методичні підходи для електрохімічної ресстрації перебігу ферментативних реакцій та ефекту інгібування ферментів іонами важких металів.

2. Розробити лабораторний макет автоматизованого біосенсора для інтегральної оцінки вмісту важких металів у водних розчинах.

3. Розробити лабораторні макети біосенсорів, чутливих до певних іонів важких металів у водних розчинах.

4. Розробити прототип мультиферментного сенсора для аналізу суміші різних іонів важких металів.

ІНТЕ ім. В. Стефаники
АН України

Наукова новизна роботи. В роботі вперше:

- створено лабораторну модель високочутливого ферментного кондуктометричного біосенсора для експрес-аналізу концентрацій іонів важких металів у водних розчинах;

- показана вибіркова чутливість алкогольоксидази, глюкозооксидази та бутирилхолінестерази до іонів ртуті, срібла та свинцю відповідно, і вперше такі ферменти використано як основу чутливого біоелементу сенсорів для визначення цих іонів у концентраціях від 1 до 100 мкМ;

- показана можливість використання потенціометричного датчика зі світловою адресацією як основи мультибіосенсора для одночасного аналізу суміші різних іонів важких металів.

Практична цінність роботи. Досліджено можливість створення біосенсорів для як інтегрального, так і селективного визначення концентрацій іонів важких металів у водних розчинах. Створено лабораторні моделі аналітичних систем, які можуть бути основою промислових варіантів автоматизованих ферментних сенсорів для визначення концентрацій іонів важких металів при проведенні екологічного моніторингу.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на Республіканській науково-технічній конференції "Новые возможности современного биомедицинского приборостроения" (Ворзель, Україна, 1991), на Міжнародних конференціях: "The Fifth Int. Meeting on Chemical Sensors" (Рим, Італія, 1994), "Eurosensors VIII" (Тулуза, Франція, 1994); "7th European Congress on Biotechnology", (Ніца, Франція, 1995); "The Fourth World Congress on Biosensors", (Бангкок, Тайланд, 1996), "International Workshop Bioencapsulation V", (Потсдам, Німеччина, 1996), "NATO Advanced Research Workshop on biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field" (Смоляниця, Словачія, 1997).

Публікації. Основні положення дисертації викладено у 9 наукових працях, у тому числі в 3 статтях.

Особистий внесок дисертанта. Всі дослідження виконано з ініціативи автора та за його безпосередньої участю в експериментах і аналізі отриманих результатів.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини з результатами роботи та їх обговоренням, висновків, а також списку літератури, який включає 117 найменувань. Робота викладена на 142 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації поданий у вигляді 29 рисунків та 4 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували такі реактиви: уреаза марки Б з бобів сої (КФ 3.5.1.5, виробництво Олайнського заводу хімреактивів, Литва) з активністю 12 од.акт./мг; β -глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4, виробництво Косарського спиртозаводу Черкаського виробничого об'єднання спиртової промисловості) з активністю 168 од.акт./мг; бутирилхолінестераза (БХЕ) з сироватки крові коня (КФ 3.1.1.8, виробництво фірми "Sigma") з активністю 266 од.акт./мг; алкогольоксидаза (АО) з *Hansenula polymorpha*, отримана від д-ра Т. Гібсона (Лідс, Великобританія); сироватковий альбумін бика (БСА) фірми "Boehringer Mannheim"; 25 % розчин глутарового альдегіду (ГА), інозитол та параформальдегід фірми "Serva"; ДЕАЕ-декстран фірми Pharmacia.

Субстрати: глюкоза, сечовина та бутирилхолін хлорид були виробництва фірми "Sigma".

Для приготування буферних розчинів використовували Тріс фірми "Reanal". Необхідні значення рН досягались титруванням розчину трісу азотною кислотою.

Для інактивації ферментів використовували водні розчини таких солей: $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, AgNO_3 , $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$.

Реактиви, що застосовувались в роботі, були вітчизняного чи закордонного виробництва і мали кваліфікацію "ос. ч." та "х. ч."

Дослідження проводили за допомогою електрохімічних перетворювачів

виробництва НДІ Мікроприлад (Київ) та іноваційного центру «Емокон» (Київ).

Методики створення ферментних біоматриць на поверхні електродів детально описано у роботах [Soldatkin et al, 1993, Gibson et al, 1992].

Методика біоелектрохімічного визначення токсичності іонів важких металів не потребує термостатування, тривалої підготовки обладнання та матеріалів. Тест проводиться безперервно у режимі часових циклів. Кожний цикл складається з стадій контрольного дослідження, вимірювання й реактивації у межах заданої тривалості циклу (15–40 хв), що добирається залежно від конкретних умов. Концентрація інгібітора у пробі визначається за зменшенням сигналу біосенсора відносно калібрувального графіка [Zhylyak et al, 1995].

Автоматизація процесу отримання та обробки аналітичного сигналу від біосенсора здійснюється за допомогою IBM комп'ютера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ОЦІНКИ ВПЛИВУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

Характеристики рН–ПТ та тонкопліткових кондуктометричних електродів, що є фізичними (електронними) елементами біосенсорів, детально описані у статтях співробітників нашої лабораторії [Soldatkin et al, 1993].

Застосування двох типів електрохімічних детекторів обумовлено їхніми особливостями, а саме:

1) кондуктометричні електроди дають можливість тестувати досить широке коло біохімічних реакцій, оскільки всі зміни у кількості та рухливості заряджених часток позначаються на провідності зразка, що аналізується. Ця властивість забезпечує високу чутливість методу, але значні неспецифічні впливи (залежність провідності від іонної сили буферу, розведення зразка при внесенні проби, різниця у дифузійних властивостях біомембран і т. ін.) ускладнюють реєстрацію корисного сигналу.

2) рН-ПТ у порівнянні з тонкоплівковим кондуктометричним електродом являє собою значно складніший, а отже і дорожчий мікроелектронний виріб. рН-ПТ реагують тільки на зміну рН середовища, що знижує чутливість і зменшує число реакцій, які тестуються, але при цьому, завдяки своїй селективності, менше піддаються впливу неспецифічних змін у зразку.

Враховуючи це, кондуктометричний метод вимірювань, як простіший та універсальніший, було використано для відпрацювання методики вимірювань та одержання основних експериментальних даних. Кондуктометричний тонкоплівковий електрод з імобілізованою уреазою став також основою макету портативного біосенсора для інтегральної оцінки токсичності іонів важких металів у водних розчинах.

Використання потенціометричних ферментних електродів (рН-ПТ) ставило за мету: 1) дати порівняльний аналіз двох типів електрохімічних перетворювачів, що досить часто використовуються при конструюванні біосенсорів; 2) продемонструвати можливість застосування деяких імобілізованих ферментів та принципу іоноселективної потенціометрії для розробки мультисенсора на основі інтегрального рН-чутливого потенціометричного датчика зі світловою адресацією.

Аналіз кінетики фермент-субстратної взаємодії

На основі кондуктометричного перетворювача та рН-ПТ було створено експериментальні пристрої для безперервної кількісної оцінки швидкості реакції, яка каталізується ферментом, що дозволяло визначати кінетичні параметри досліджуваних ферментів (максимальна швидкість ферментативної реакції - V_{\max} , константа Міхаеліса - K_m , константи інгібування - K_i , конкуренція інгібіторів із субстратом). Для досліджених ферментів значення K_m та V_{\max} були отримані за методом подвійних зворотніх величин.

На рис. 1. представлені залежності відносної швидкості (V/V_{\max}) ферментативної реакції гідролізу сечовини імобілізованою уреазою від концентрації субстрату. Після внесення сечовини у розчин величина відгуку досягала максимуму за 2 - 3 с.

Для імобілізованої в альбумінової мембрані уреазі, величина K_m за сечовиною становить 2,1 - 2,4 мМ при 20° С та рН 7,4.

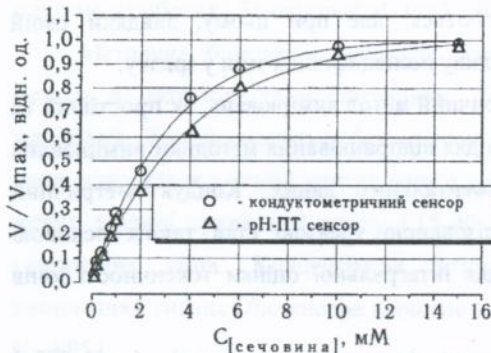


Рис. 1. Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації сечовини. Вимірювання проводились за допомогою уреазних кондуктометричного (1) та рН-ІТ (2) біосенсорів у 5мМ TRIS- HNO_3 буфері, рН 7.4.

Визначена за тих же умов величина K_m для розчиненого ферменту становила 1,5 мМ.

На рис. 2. представлено криву залежності швидкості реакції від концентрації уреазі в розчині. Видно, що вона прямо пропорційна концентрації ферменту з коефіцієнтом кореляції $R=0.9991$. Використовуючи таку криву, можна визначати концентрацію ферменту в невідомому зразку.

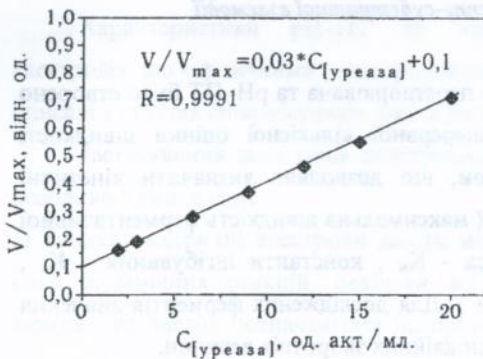


Рис. 2. Залежність швидкості ферментативної реакції гідролізу сечовини від концентрації уреазі в розчині. Вимірювання проводились за допомогою кондуктометричного сенсора в 5 мМ TRIS- HNO_3 буфері, рН 7.4, концентрація сечовини - 4 мМ.

Аналогічні експерименти було проведено при визначенні каталітичної активності імобілізованих ГОД, БХЕ та АО. Отримані значення K_m та час аналізу для імобілізованих ферментів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Значення K_m , та час аналізу для імобілізованих ферментів.

Фермент	K_m , мМ	Час аналізу, с.
Уреаза	2,1 - 2,4	3
Глюкозооксидаза	3,8 - 4,0	3
Бутирилхолінестераза	3,9 - 4,2	2
Алкогольоксидаза	320 - 400	4

Аналізуючи експериментальні дані, можна зробити наступні висновки:

- 1) величини K_m для досліджених ферментів подібні до величин, отриманих за допомогою класичних біохімічних методів [Reithel et al, 1977].
- 2) сенсор на основі кондуктометричних електродів характеризується меншим (у 1,5-2 рази) часом відгуку, у порівнянні з рН-ПТ. Розбіжність між вимірами кондуктометричного датчика дорівнює 15%, проти 10% для рН-ПТ.
- 3) глюкозний датчик витримує до 100 вимірів, а уреазний, холінестеразний та алкогольоксидазний - до 20 вимірів без зменшення величини сигналу.

Інгібіторний аналіз

В основу розробки покладено явище інгібування каталітичної активності ферментів іонами важких металів, наявними у аналізованій рідині. Цей ефект пояснюється взаємодією іонів важких металів переважно з тільними групами аміно-кислотних залишків ферментів [Узбб, 1966]. В деяких публікаціях повідомляється про застосування біосенсорних пристроїв для визначення інгібіторів ферментів [Rogers, 1995; Никольская, 1994].

В даній роботі було проаналізовано ферменти: уреаза, БХЕ, ГОД, та АО, з яких перша і раніш застосовувалась для визначення іонів важких металів [Sakai et al, 1991]. Принципово новим елементом запропонованої розробки є використання електрохімічних аналізаторів нового покоління для реєстрації ступеня інгібування ферментів.

Уреазний біосенсор для визначення загального вмісту іонів важких металів у водних розчинах

Кондуктометричний та рН-ПТ біосенсори, з імобілізованою уреазою як чутливим елементом, були використані для оцінки загального забруднення води іонами важких металів. Портативна електронно-вимірювальна апаратура з автоматизованим процесом збору та обробки даних була розроблена та виготовлена спільно із співробітниками Національного університету ім. Т. Шевченка.

Типовий вигляд відгуку кондуктометричного сенсора з імобілізованою уреазою при проведенні інгібіторного аналізу приведено на рис. 3.

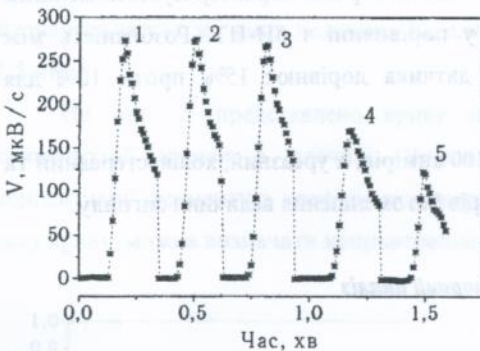


Рис. 3. Типовий вигляд відгуку кондуктометричного сенсора з імобілізованою уреазою при проведенні інгібіторного аналізу: 1, 2 - швидкість, яка відповідає 100% активності фермента, 3 - інгібування на протязі 10 хв у 1мкМ розчині Cu^{2+} , 4 - інгібування на протязі 10хв у 10мкМ розчині Cu^{2+} , 5 - інгібування на протязі 20хв у 10мкМ розчині Cu^{2+} .

Калібрувальні криві для розрахунку концентрації іонів важких металів, отримані для вільної та імобілізованої уреазы, представлені на рис. 4. Отримані залежності характеризують концентраційний інтервал, у межах якого можливо реєструвати вплив речовини на активність ферменту.

Результати експериментів однозначно вказують, що стабільність уреазы до інактивації іонами важких металів значно підвищується при імобілізації. Це можна пояснити, принаймі, двома факторами:

- 1) зменшення після імобілізації реакційної здатності тіольних груп, що важливі для активності ферменту;
- 2) зменшення ефективної концентрації інгібітора внаслідок зв'язування

певної кількості іонів металу із зарядженими групами БСА мембрани (сироватковий альбумін має 16 центрів зв'язування для Cu^{2+}) [Уэбб, 1966].

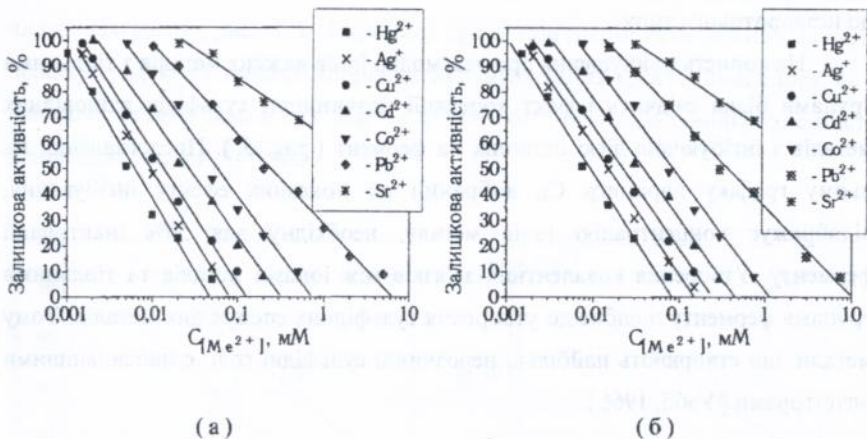


Рис. 4. Калібрувальні криві для визначення йонів важких металів за допомогою кондуктометричного біосенсора, (а) - з вільною та (б) - імобілізованою уреазою. Час преінкубації - 10 хв.

Виявилось, що межі визначення іонів важких металів кондуктометричним сенсором із застосуванням вільного ферменту, співрозмірні з гранично допустимими концентраціями (ГДК). В той же час гранична чутливість імобілізованого ферменту погіршується в середньому на порядок. Цей факт можна проілюструвати на прикладі інгібування уреазі іонами міді. Так, мінімальна концентрація, яку можна визначити при преінкубації 10хв., в системі з розчинним ферментом складає 0.8 мг/л (ГДК для Cu^{2+} дорівнює 1 мг/л), а в системі з імобілізованим ферментом - 7.0 мг/л.

Зменшення ступеню інгібування, яке спостерігалось у випадку конкуренції субстрата та інгібітора, можна вважати опосередкованим доказом взаємодії іонів важких металів з іонними групами ферменту, які важливі для каталізу.

Однак таке інгібування не є конкурентним у класичному значенні цього терміну, тому що інкубація ферменту з інгібітором до максимальної

інактивації, а потім внесення до системи субстрату навіть у високих концентраціях не зменшувало ступеню інгібування і не спричиняло витіснення інгібітора із комплексу з ферментом. Це дає можливість віднести інгібування до незворотнього типу.

На користь припущення про взаємодію іонів важких металів з тіольними групами білка свідчить і факт кореляції розчинності сульфідів відповідних металів з інгібуючою дією останніх на фермент (рис. 5.). Представлений на цьому графіку параметр C_1 , вибраний як показник ефекту інгібування, відображує концентрацію іонів металу, необхідну для 50% інактивації ферменту. Утворення ковалентних зв'язків між іонами металів та тіольними групами ферменту подібне до утворення сульфідних сполук цих металів. Тому метали, що створюють найбільш нерозчинні сульфідні солі, є найсильнішими інгібіторами [Уэбб, 1966].

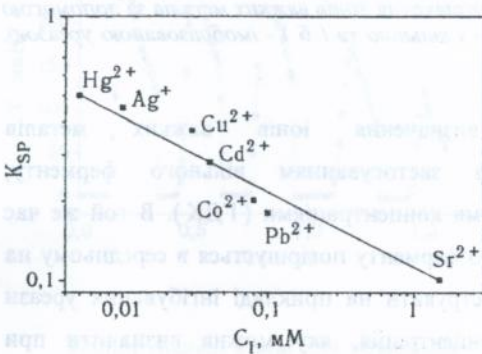


Рис. 5. Кореляція розчинності сульфідів відповідних металів (K_{SP}) з інгібуючою дією останніх на імобілізований уреазу (C_1). Дані отримані за допомогою кондуктометричного сенсора.

Незворотне інгібування з практичної точки зору характеризує стан інактивованого ферменту, коли за час відмивання, який співпадає з тривалістю преінкубації, не виявляється помітного відновлення активності ферменту. Такий тип інгібування призводить до появи прямо пропорційної залежності ступеню інактивації ферменту від часу [Диксон, 1986]. Тому визначення більш низьких концентрацій іонів важких металів можливо при збільшенні часу преінкубації (рис. 6.).

Для виявлення кореляції ступеню інгібування фермента та деяких нормованих параметрів токсичності досліджуваних металів, наприклад гранично дозволених концентрацій речовини у питній воді (ГДК), проведено аналіз діаграми (рис. 7.). Параметр $\text{tg}\alpha$ є тангенсом кута нахилу лінійної ділянки графіку (у прямих координатах) інгібування уреазы. Виявилось, що з вивчених металів тільки для Hg^{2+} , Cd^{2+} та Co^{2+} отримана лінійна залежність. Коефіцієнт кореляції- 0,965.

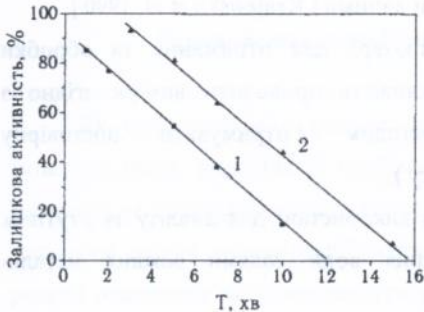


Рис. 6. Залишкова активність іммобілізованої уреазы (%) в залежності від часу преінкубації для двох концентрацій Cu^{2+} : 50 мкМ (1) і 25 мкМ (2).

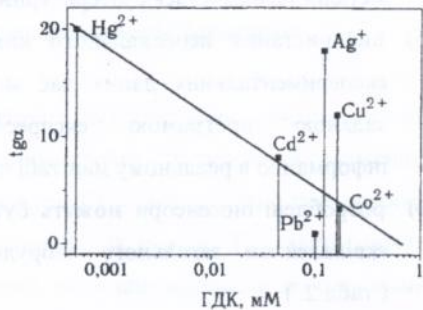


Рис. 7. Кореляція ступеню інгібування іммобілізованої уреазы ($\text{tg}\alpha$) та гранично дозволених концентрацій речовини у воді (ГДК).

Експериментальні дані свідчать про те, що:

- 1) уреазы в розчинному і в іммобілізованому стані може бути використана як біоактивний елемент сенсора чутливого до іонів важких металів.
- 2) застосування іммобілізованої уреазы має суттєві переваги у порівнянні з нативним ферментом: а) витрати ферменту менші у 1000 разів; б) диференційний метод вимірювання дозволяє виключити неспецифічні впливи на вихідний сигнал сенсора; в) преінкубація з інгібітором відбувається у реальному розчині без його небажаного розведення, тоді як активність ферменту вимірюється за оптимальних умов у буферному розчині.

ФЕРМЕНТНІ БІОСЕНСОРИ ДЛЯ АНАЛІЗУ СУМІШІ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Поряд з контролем загального забруднення води іонами важких металів, дуже важливим є розрізнене визначення останніх. За допомогою описаних вище біосенсорів було досліджено два підходи до селективної оцінки суміші іонів важких металів у водних розчинах: 1) застосування реакцій осадження чи комплексоутворення, специфічних до окремих іонів; 2) застосування ферментів, які відрізняються чутливістю до різних іонів.

Використання специфічних реактиваторів ферментів

Як було показано раніше, повторне використання сенсорного чіпа можливе після реактивації імобілізованої уреазы. Відновлення активності ферменту за допомогою різних реактиваторів було використано при розробці методики оцінки концентрації окремих іонів у їх суміші. Так, застосовуючи реакції осадження чи комплексоутворення, які є специфічними до окремих іонів, можна по черзі "звільнювати" фермент від інгібіторів. На рис. 8. показано приклад поступової реактивації уреазы, яка була імобілізована на кондуктометричному електроді та оброблена розчином іонів Hg^{2+} , Ag^+ , та Pb^{2+} . Активність ферменту вимірювалась щоразу після відмивки чіпа у розчинах, що містили 10^{-2} М $(NH_4)_2S$, KI чи ЕДТА. Розрахунок вмісту іонів важких металів у пробі проводять за калібрувальними графіками.

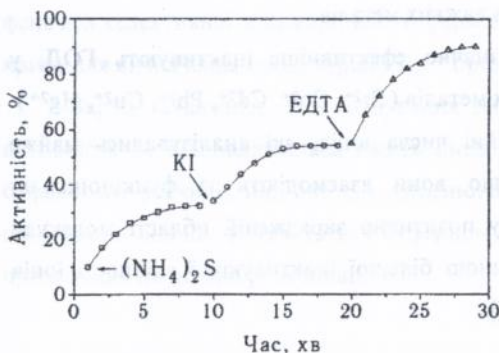


Рис. 8. Поступове відновлення активності імобілізованої уреазы, яка була оброблена розчином іонів Hg^{2+} , Ag^+ та Pb^{2+} . Активність ферменту вимірювалась щоразу після відмивки чіпа у розчинах, що містять 10^{-2} М $(NH_4)_2S$, KI та ЕДТА.

Для цієї методики характерна велика кількість та складність маніпуляцій (п'ятиразове визначення активності фермента в одному циклі вимірювань), та досить велика тривалість досліду (близько 70 хв.). Цей час, в основному, визначається необхідністю ретельної відмивки чіпа після кожного етапу реактивації, інакше іони осаджувача дають сильний фоновий сигнал та можуть впливати на активність ферменту.

Крім того, суттєвим недоліком методу є складність вибору окремого реактиватора до кожного іону. Метод також характеризується низькою точністю - помилка аналізу сягає 20%.

Використання ферментів, які відрізняються чутливістю до окремих інгібіторів

В даній частині роботи з використанням методів ферментативної кінетики та електрохімічного аналізу було проведено пошук ферментів, які вибірково інгібуються певними іонами важких металів у концентраціях, які відповідають значенням ГДК.

Ферменти: ГОД, БХЕ та АО, імобілізовані на поверхні рН-ПТ детекторів, застосовувалися як біоактивні елементи сенсорних систем, чутливих до Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} у діапазоні від 1 до 100 мкМ.

Ag^+ чутливий біосенсор на основі ГОД

Раніше [Soldatkin et al, 1993] був розроблений біосенсор на основі рН-ПТ та ГОД для визначення концентрації глюкози. Цей біосенсор нами було використано для аналізу іонів важких металів.

Виявилося, що іони Ag^+ значно ефективніше інактивують ГОД, у порівнянні з іонами двоцвалентних металів (Sr^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}). Оскільки розміри та координаційні числа іонів, які аналізувались майже ідентичні, можна припустити, що вони взаємодіють із функціонально важливою групою, розміщеною у позитивно зарядженій області молекули фермента, що і може бути причиною більшої інактивуючої здібності іонів срібла [Бурлакова А.А. та ін. 1995].

Залежність вихідного сигналу біосенсора від логарифму концентрації Ag^+ -лінійна у діапазоні концентрації інгібітора 1 — 100 мкМ (рис. 9.). Для імобілізованої у БСА мембрані ГОД спостерігався зворотний, конкурентний відносно глюкози тип інгібування. Значення K_M складає 1,43 мМ, K_I (рис. 10.) — 11 мкМ. Було також показано, що активність імобілізованої ГОД після інгібування Ag^+ повністю відновлювалася в результаті 15 хв відмивання у 5 мМ Tris-HNO_3 , рН 7.5.

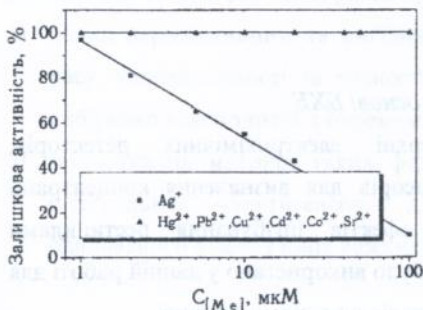


Рис. 9. Залишкова активність імобілізованої ГОД в залежності від концентрації інгібітора.

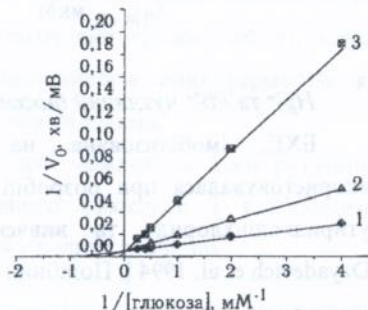


Рис. 10. Ідентифікація конкурентного інгібування за допомогою графіка Лайнуївера-Берка. 1- у відсутності інгібітора, 2- 10 мкМ Ag^+ , 3- 100 мкМ Ag^+ .

Hg^{2+} чутливий біосенсор на основі АО

При вивченні інгібування АО іонами важких металів було виявлено феномен селективної взаємодії цього ферменту з іонами Hg^{2+} . Калібрувальну криву для визначення концентрації Hg^{2+} представлено на рис. 11.

Варто зауважити, що інгібування АО було незворотним, оскільки її активність не відновлювалася навіть після тривалого періоду відмивання у буферному розчині, подібно до уреазного біосенсору. Проте, відмивання сенсорного чіпа на протязі 15 хв у буферному розчині, що містить 5 мМ ЕДТА, призводило до повної реактивації АО.

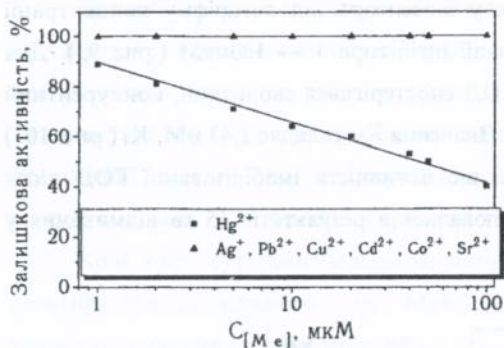


Рис. 11. Залишкова активність іммобілізованої АО в залежності від концентрації інгібітора.

Hg^{2+} та Pb^{2+} чутливий біосенсор на основі БХЕ

БХЕ, іммобілізована на поверхні електрохімічних детекторів, використовувалася при розробці біосенсорів для визначення концентрації бутирилхолінхлориду та вивчення ефектів інгібування пестицидами [Dzyadevich et al, 1994]. Подібний підхід було використано у данній роботі для селективного визначення іонів важких металів у водному розчині.

Калібрувальні криві для аналізу іонів важких металів кондуктометричним біосенсором представлені на рис. 12.

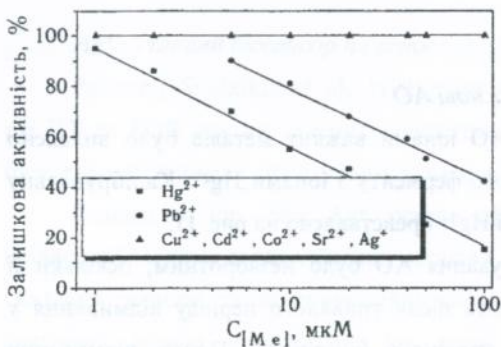


Рис. 12. Залишкова активність іммобілізованої БХЕ (%) в залежності від концентрації інгібітора.

Як видно із малюнка, тільки Hg^{2+} та Pb^{2+} у концентраціях нижче 100 мкМ сильно пригнічують ферментативну активність БХЕ. Інші іони, які тестувалися, не виявляли помітного впливу на ферментативну активність у цих

же концентраціях. Було показано, що інгібування БХЕ іонами ртуті та свинцю є незворотним, як і для уреазі та АО.

Повторне використання сенсорного чіпа для визначення іонів важких металів було можливим тільки після реактивації іmobilізованої БХЕ за допомогою ЕДТА. Відхилення між вимірами не перевищували 15%.

Таким чином, з результатів вивчення двох варіантів вибіркового аналізу іонів важких металів за допомогою ферментних біосенсорів (поступова реактивація та використання різних ферментів) можна зробити такі висновки:

- 1) більш перспективним та вигідним за критеріями трудомісткості, затрат часу, універсальності та точності є варіант використання ферментів, які вибірково взаємодіють з окремими токсичними іонами.
- 2) застосування матриці таких ферментів дає можливість конструювання інтегральних мультисенсорів для повного (якісного і кількісного) одночасного аналізу іонів важких металів у водних розчинах.

Мультиферментна аналітична система на основі інтегрального сенсора зі світловою адресацією (ICSSA)

Як було показано, ступень інгібування ряду ферментів іонами важких металів, можна успішно оцінювати за допомогою потенціометричних електродів (рН-ПТ).

Метод рН-селективної потенціометрії використовується також і в ICSSA, які розробляються на основі монолітних напівпровідникових структур. Принцип дії ICSSA заснований на залежності величини фотоструму у напівпровіднику від заряду на поверхні структури. Обов'язковою складовою частиною автоматизованої вимірювальної системи на основі ICSSA є персональний комп'ютер, який забезпечує можливість оперативної обробки масивів даних у режимі реального часу та підтримання оптимальних умов проведення експерименту.

Демонстрація можливості одночасного аналізу іонів різних металів за допомогою ферментного ICSSA була метою експериментів, представлених у данному розділі.

Характеристика діелектричних плівок

Діелектричні плівки, нанесені на напівпровідник в ІССА, виконують роль як пасивного елемента (власне діелектрик), так і роль хімічно чутливої поверхні (рН-чутливої). Це пред'являє досить жорсткі вимоги до якості діелектрика, які ускладнюються ще і тією обставиною, що площа контакту з електролітом повинна бути досить великою (1.2–2.0 см²).

З метою оптимізації якості діелектричних плівок та підбору оптимальних умов для вивчення процесу проходження ферментних реакцій було досліджено ряд рН-чутливих покриттів. Результати експериментів приведено у таблиці 3.

Для подальших досліджень вибрано пластини з двошаровим діелектричним покриттям Si₃N₄ та SiO₂ по сукупності таких характеристик як: рН-чутливість, співвідношення сигнал-шум, надійність.

Таблиця 3. Характеристики діелектричних плівок.

Склад діелектрика	Товщина	рН чутливість
SiO ₂	0.04-0.10 мкм	24-35 мВ/рН
Si ₃ N ₄ (SiO ₂)	0.05-0.20 мкм (0.05 мкм)	35-45 мВ/рН
Ta ₂ O ₅	0.08 мкм	48-60 мВ/рН

Визначення дифузійної довжини основних носіїв заряду

Оптимальні умови генерації фотоструму у зразках були визначені за результатами вимірювання дифузійної довжини носіїв заряду методом рухливої світлової плями. Пік на кривій залежності величини сигналу від відстані між світловою плямою та зондом пояснюється накладанням на дифузійну криву функції генерації при суміщенні світлової плями із зондом. Дослідження показали, що дифузійна довжина носіїв складає 150 мкм. Таким чином, по-перше, фото-струм формується носіями, які генеруються в області просторового заряду, та які дифундують із об'єму напівпровідника; по-друге, локальність вимірів визначається, в основному, площею, яка освітлюється.

Визначення концентрацій субстратів та інгібіторів

Основною проблемою при вимірюваннях за допомогою ІССА кінетики декількох ферментативних реакцій одночасно, є стабільна робота різних ферментів у однакових реакційних умовах (тип буферу, його рН, іонна сила і т. ін.) та за присутності неспецифічних субстратів. Досліджені ферменти проявляють активність у 5 мМ Тріс- HNO_3 буфері, рН 7.5. Присутність неспецифічних субстратів у реакційній суміші не впливала на активність ферментів.

Ці дані були підтверджені при визначенні кінетики ферментативних реакцій за допомогою ІССА. Досліджувалися ферментативні реакції, каталізовані уреазою та БХЕ. Для визначення концентрацій субстратів на поверхні діелектрика формувалися три мембрани шляхом полімеризації ферментів та БСА у випарах ГА. Дві з них містили різні ферменти, а третя являла собою мембрану порівняння (БСА без ферменту).

Типовий вигляд залежності відгуку мультисенсора від часу показано на рис. 13. За допомогою цього сенсора можливо одночасно визначати концентрацію сечовини та бутирилхолін хлориду в межах 0.1 - 3 мМ. Амплітуди та швидкість відгуків як для бутирилхолін хлориду, так і для сечовини подібні до результатів моноферментного аналізу.

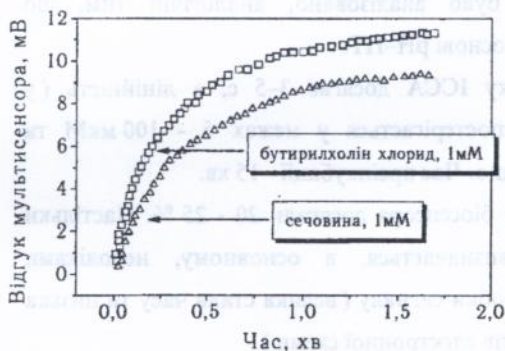


Рис. 13. Типовий вигляд відгуку мультисенсора на сечовину та бутирилхолін хлорид у 5 мМ Тріс- HNO_3 буфері, рН 7.5.

Проведені експерименти показали можливість створення мультиферментного біосенсора на основі потенціометричного інтегрального сенсора зі світловою адресацією для визначення концентрацій субстратів.

ИССА було також випробувано для експрес-аналізу суміші іонів ртуті та міді у водному розчині. Імобілізовані ферменти уреази та БХЕ використовувалися як біоселективні елементи сенсора. Залежності відгуку мультисенсора від часу при роздільному визначенні концентрацій іонів Hg^{2+} та Cu^{2+} у суміші, представлені на рис. 14.

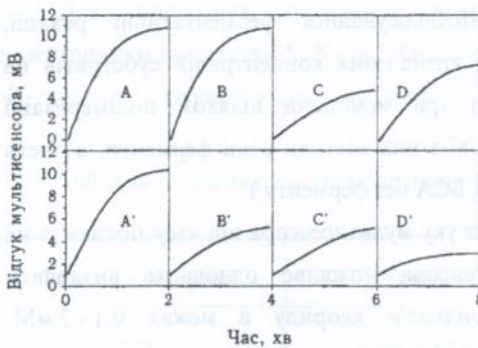


Рис. 14. Залежності відгуку мультисенсора від часу при визначенні концентрацій іонів Hg^{2+} та Cu^{2+} .

Аналіз активності імобілізованої БХЕ (A, B, C, D) та уреази (A', B', C', D') у відсутності інгібіторів (A-A'), 20 мкМ Cu^{2+} (B-B'), 10 мкМ Hg^{2+} (C-C'), 20 мкМ Cu^{2+} та 5 мкМ Hg^{2+} (D-D')

Показано, що залежності сигналу ИССА на основі уреази та БХЕ від іонного складу розчину, який було аналізовано, аналогічні тим, що спостерігаються для біосенсорів на основі рН-ПТ.

Встановлено, що час відгуку ИССА досягає 3–5 с, а лінійність (у напівлогарифмічному масштабі) спостерігається у межах 5 - 100 мкМ та 10-150 мкМ для Hg^{2+} і Cu^{2+} відповідно. Час преінкубації - 15 хв.

Розбіжності величин сигналу біосенсора досягали 20 - 25 %. Настільки значна помилка вимірювання визначається, в основному, недоліками електронних схем реєстрації та обробки сигналу (велика стала часу та низька електрозавадозахищеність елементів електронної схеми).

Швидкодія електронної апаратури має вирішальне значення для нормальної роботи ИССА у реальному масштабі часу, так як при збільшенні

кількості чутливих ділянок сенсору прямо пропорційно падає дискретність отриманих даних і, відповідно, зменшується точність методу.

Необхідно підкреслити, що даний тип перетворювача (ICCA) володіє, по відношенню до рН-ПТ, наступними перевагами:

а) процес виробництва набагато простіший і сумісний із стандартними методами мікроелектроніки. Він не потребує додаткової розробки специфічної технології.

б) чутлива поверхня датчика вільна від будь-яких електричних контактів. В результаті знімається значна і досить критична для рН-ПТ проблема капсуляції.

в) чутлива поверхня сенсору є ідеально плоскою, що дає можливість застосовувати вкрай малі вимірювальні об'єми.

г) метод світлової адресації дозволяє на одному монокристалі створити незалежні інформаційні області. Це значно спрощує можливість створення мультибіосенсора.

Вказані особливості підтвержують перспективність та необхідність розробки даного типу потенціометричного перетворювача та його застосування для різних типів біосенсорів.

ВИСНОВКИ

1. Створена лабораторна модель уреазного кондуктометричного біосенсора для експресного визначення загального вмісту іонів важких металів у водних розчинах у межах 0,1 - 50 мкМ за ртутним еквівалентом, що співрозмірно з існуючими ГДК.

2. За допомогою біосенсорних систем встановлено, що ферменти алькогольоксидаза, глюкозооксидаза та бутирилхолінестераза мають підвищену чутливість до іонів ртуті, срібла та ртуті-свинцю відповідно.

3. З використанням лабораторної моделі потенціометричного сенсора на основі рН-ПТ перетворювачів та указаних ферментів було отримано калібрувальні графіки для визначення окремих іонів у концентраціях від 1 до 100 мкМ.

4. Показана принципова можливість застосування потенціометричного датчика зі світловою адресацією як основи мультиферментного сенсора для одночасного визначення концентрацій іонів різних важких металів.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. S.V.Patskovsky, G.A.Zhylyak, A.K.Babak, A.A.Shul'ga, A.P.Soldatkin, V.I.Strikha. Investigation of the characteristics of LAPS biosensor // *Abstr. of The Conf. "New possibilities of modern medical equipments"*, Vorzel', Ukraine, October 21-24, - 1991, - P. 87.
2. S.V.Dzyadevich, G.A.Zhylyak, Y.I.Korpan, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Application of conductometric biosensors for studing urease inactivation by heavy metal ions // *Proc. The Fifth Int. Meeting on Chemical Sensors*, Rome, - Italy - 1994. --P. 189-192
3. S.V.Dzyadevich, G.A.Zhylyak, A.P.Soldatkin, A.A.Shul'ga, V.N.Arkipova, V.I.Strikha, A.V.El'skaya. Conductometric enzyme biosensors for determining of concentration of some substrates and inhibitors // *Abstr. of 7th European Congress on Biotechnology*, Nice, France. - V. 1. - 1995. - P. 92.
4. G.A.Zhylyak, S.V.Dzyadevich, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Conductometric biosensor for heavy metal ions determination // *Abstr. of 7th European Congress on Biotechnology*, Nice, France. - V. 1. - 1995. - P. 83.
5. G.A.Zhylyak, S.V.Dzyadevich, Y.I.Korpan, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Application of urease conductometric biosensor for heavy metal ions determination // *Sensors & Actuators*, - 24-25, N 1-3. - 1995. - P. 145-148.
6. S.V.Dzyadevich, G.A.Zhylyak, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Conductometric urease microbiosensor based on thinfilm interdigitated electrodes for urea determination // *Биополимеры и клетка*, - 1996. - 12.- № 1. - С. 46-50.
7. El'skaya A.V.,Soldatkin A.P., Korpan Y.I., Zhylyak G.A., Dzyadevich S.V., Piletsky S.A. Biosensors based on conductometric detection // *Abstr.The Fourth World Congress on Biosensors*, Bangkok, Thailand. - 29-31 May, - 1996. - P.46.
8. S.V.Patskovsky, Zhylyak G.A., Light-addressable potentiometric multisensor // *"International Workshop Bioencapsulation V"*, Potsdam, Germany, September 23-25, 1996 - P. 30.
9. Soldatkin A.P. Korpan Y.I., Zhylyak G.A., Martelet C., El'skaya A.V., Selective detrmination of heavy metal ions with biosensors coupled to immobilized enzymes // *"NATO Advanced Research Workshop on biosensors for direct monitoring of environmental pollutans in field"* Smolenice, Slovakia, May 3-9, 1997 - P. 87.

Zhylyak G.A. Development of enzyme biosensors for heavy metal ions determination (Manuscript).

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, Special Option - Biotechnology, A.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

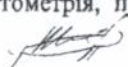
The results on elaboration of laboratory prototype of highly-sensitive enzyme biosensors for heavy metal ions determination are presents in the thesis. The biosensors based on immobilized urease, glucose oxidase, alcohol oxidase and butyryl cholinesterase were developed and a possibility of specific quantitative and qualitative estimation of silver, mercury and lead ions in water solutions was shown. The dynamic range of such analytical systems was 1 - 100 μM for the heavy metal ions. The integration of different enzymes and light-addressable potentiometric sensor, produced by microelectronics semiconductor technology gives the possibility to elaborate multifunctional biosensors for selective analysis of substrates (butyryl choline chloride and urea) and inhibitors (heavy metal ions).

Жиляк Г. А. Разработка ферментных биосенсоров для определения концентраций ионов тяжелых металлов в водных растворах (Рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23 – биотехнология, Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 1997.

В диссертационной работе представлены результаты по разработке лабораторных макетов ферментных биосенсоров для определения концентраций ионов тяжелых металлов в водных растворах. Показано, что в диапазоне концентраций 1 — 100 мкМ ионы серебра, ртути и свинца оказывают ингибирующий эффект на ферменты: глюкозооксидазу, алкогольоксидазу и бутирилхолинэстеразу соответственно. Впервые эти ферменты были использованы в качестве основы чувствительного элемента сенсора для селективного определения концентраций ионов тяжелых металлов. Показана возможность разработки мультибиосенсора на основе потенциометрического сенсора со световой адресацией для одновременного измерения концентраций субстратов (бутирилхолин хлорида и мочевины) и ингибиторов (ионов тяжелых металлов).

Ключові слова: біосенсор, кондуктометрія, потенціометрія, ферменти, інгібітори, іони важких металів.



Підписано до друку 19.05.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 182.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

1137011

AB 37.909