

Протеолитический биосенсор на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. 2. Характеристика работы в модельных условиях

О. А. Белоиван*, А. П. Солдаткин, Н. Ф. Стародуб¹, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

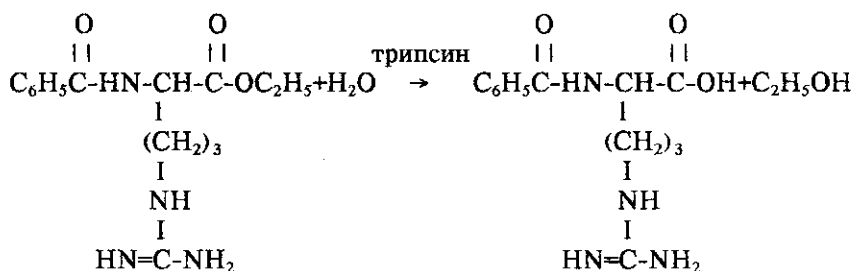
¹ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
252030, Киев, ул. Леонтовича, 30.

Создана модель биосенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и фермента трипсина, иммобилизованного на затворную область, который может стать базой при создании биосенсора для определения концентрации общего белка в биологических жидкостях. Подобраны оптимальные условия проведения измерений, изучена стабильность и точность его работы. Модель позволяет находить концентрацию искусственного субстрата Na-бензоил-аргинин-этилового эфира в диапазоне 0,2—2,0 мМ в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) и 0,5—5,0 мМ в универсальном буфере (рН 7,0). Установлена существенная зависимость величины отклика сенсора от рН, буферной емкости и ионной силы рабочего буфера. Показания сенсора достаточно стабильны к колебаниям температуры и практически не изменяются в течение месяца при его хранении в буферном растворе при 4 °С. Полученные результаты обсуждены в связи с проблемой определения концентрации общего белка в биологических жидкостях.

Введение. Процесс создания биосенсора включает в себя решение ряда вопросов: выбор преобразователя и специфической реакции, которая может быть использована для идентификации анализируемого вещества, осуществление интеграции биологического материала и поверхности преобразователя с сохранением его активности, выбор оптимальных условий для проведения измерений, а также исследование влияния различных факторов на величину регистрируемого сигнала, определение стабильности и точности работы сенсора, условий хранения полученного устройства. Анализ опубликованной литературы, а также проведенные нами предварительные исследования позволили сделать вывод о возможности создания протеолитического биосенсора путем химической интеграции фермента трипсина и затворной области ионоселективных рН-чувствительных полевых транзисторов (рН-ПТ). Идея заключается в использовании ферментативного гидролиза протеинов как источника протонов, локально изменяющих рН вблизи поверхности преобразователя, что в свою очередь модулирует потенциал затвора рН-ПТ, задающий ток через структуру. Такой биосенсор может быть использован для анализа концентраций искусственных субстратов, а также общего белка в биологических жидкостях. Ниже представлена схема гидро-

*Correspondence address.

лиза искусственного субстрата N α -бензоил-аргинин-этилового эфира (BAEE), растворы которого использовались нами в качестве модельной системы для создания макета протеолитического биосенсора.



Подобные разработки уже проводились [1]. Однако созданные ранее сенсоры на основе рН-ПТ и ферментов трипсина и хемотрипсина обладали низкой стабильностью — 5—10 сут и имели ограниченную область применения. Опубликованные на эту тему данные демонстрируют принципиальную возможность создания датчика с использованием ферментативного гидролиза для анализа концентраций искусственного субстрата. Задача определения содержания общего белка в биологических жидкостях требует проведения комплексных исследований по влиянию температуры, концентраций солей, рН и концентрации буфера на величину сигнала сенсора, а также повышения его стабильности.

Ранее нами были подобраны условия иммобилизации трипсина на поверхность преобразователя рН-ПТ, изучены свойства и условия хранения иммобилизованного трипсина. В настоящей работе представлены результаты исследований особенностей функционирования сенсора в условиях влияния различных факторов, характерных для биологических жидкостей, и его основные характеристики.

Материалы и методы. Конструкция сенсора на основе рН-ПТ, а также измерительная схема описаны ранее [2]. В основе определения концентрации субстрата лежит измерение дифференциального сигнала двух рН-ПТ, смонтированных на одном сенсорном чипе, один из которых содержит иммобилизованный фермент, а другой — мембрану сравнения.

В работе использовали препарат трипсина (ЕС 3.4.21.4) из поджелудочной железы свиньи с активностью 1.000—2.000 ед. BAEE/мг и субстрат BAEE фирмы «Sigma» (США), бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Serva» (ФРГ), глутаровый альдегид (ГА) фирмы «Fluka» (Швейцария), соли и другие реактивы отечественного производства с квалификацией «осч» и «хч».

Универсальный буфер (рН 5,0—9,0) готовили следующим образом: 50 мл раствора, содержащего 10 мМ лимонную кислоту (2,101 г/л), 10 мМ NaH₂PO₄ (1,380 г/л), 10 мМ натрий тетроболат (1,907 г/л), 10 мМ трис-НСl (1,21 г/л), 10 мМ KCl (0,746 г/л), титровали 40 мМ NaOH до ветвующих значений рН. Затем доводили объем растворов до 200 мл.

Фосфатный буфер (рН 7,5) готовили из 200 мМ растворов солей K₂HPO₄·3H₂O и NaH₂PO₄·2H₂O. Приготовленный буфер растворяли до нужной концентрации и проверяли рН.

Биоматрицу, содержащую трипсин, иммобилизованный в белковом слое с помощью ГА, формировали капельным способом на затворной области рН-ПТ. Для этого готовили раствор, содержащий 2,0 % трипсина, 8,0 % БСА, 2,5 % глицерина в 20 мМ фосфатном буфере (рН 7,5), и наносили каплю на область затвора одного рН-ПТ. На затворную область второго рН-ПТ наносили 10 %-й раствор БСА в том же буфере, содержащем также

2,5 % глицерина. Этот транзистор служил датчиком сравнения. Затем чип погружали в атмосферу насыщенных паров ГА на 2,5 ч при комнатной температуре, после чего подсушивали мембраны на воздухе. Перед работой структуру трижды промывали 10 мМ фосфатным буфером (pH 7,5) и вымачивали в том же буфере в течение 0,5—1,0 ч. Для измерения pH-зависимости в универсальных буферах с диапазоном pH 5—9 структуры предварительно вымачивали в соответствующих буферах.

Перед нанесением мембран датчики вымачивали в 1 мМ фосфатном буфере (pH 7,5) в течение 0,5—1,0 ч, после чего проверяли их pH-чувствительность, которая была линейной в диапазоне pH от 3,0 до 10,0 и обычно составляла 40—45 мВ/pH. После нанесения мембраны датчики хранили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,5) при 4 °С. Чувствительность к субстрату измеряли при комнатной температуре в открытом сосуде при интенсивном перемешивании. Концентрацию аналита меняли путем добавления аликвот 10 мМ и 100 мМ раствора. Неспецифические изменения выходного сигнала, связанные с колебаниями температуры, pH среды, электрическими наводками, подавлялись благодаря использованию дифференциальной схемы измерений. Поскольку толщина наносимых мембран не была стандартизирована, сравнение абсолютных величин максимального сигнала проводили отдельно для каждого сенсора.

Результаты и обсуждение. Типичный вид временной зависимости величины отклика биосенсора на изменение концентрации ВАЕЕ в растворе представлен на рис. 1. Базовая линия выписывалась в отсутствие субстрата. После внесения ВАЕЕ максимальная величина отклика достигалась в течение 1,5—5,0 мин. Наблюдаемые колебания времени достижения максимального отклика могут быть обусловлены составом буферного раствора, количеством вносимого субстрата, а также различиями в толщине биомембраны, о чем упоминалось выше.

Результаты изучения зависимости максимальной величины отклика от pH исследуемого раствора представлены на рис. 2. Измерения проводили в универсальном буфере (pH 5,0—9,0), поскольку его буферная емкость практически одинакова в широком диапазоне pH. Кривая pH-зависимости имеет колоколообразную форму с максимумом при pH 7,0—7,5. Это согласуется с данными по колориметрическому определению зависимости

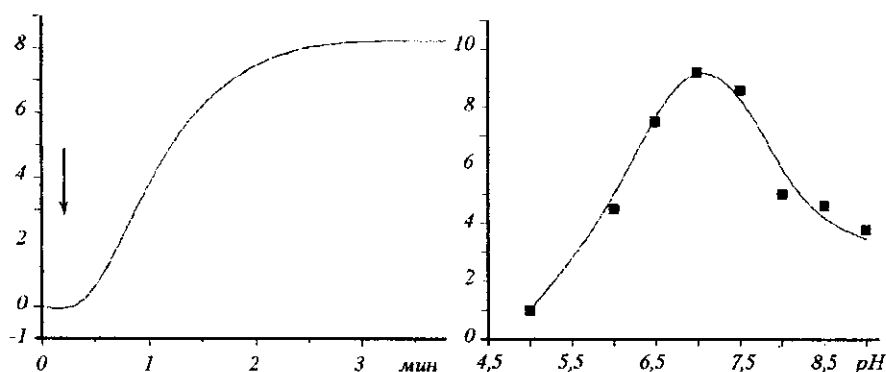


Рис. 1. Вид сигнала биосенсора на ВАЕЕ (0,1 мМ) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,0. Момент внесения субстрата обозначен стрелкой. Здесь и на рис. 2 по оси ординат — величина сигнала, мВ

Рис. 2. Зависимость величины сигнала биосенсора на 1 мМ ВАЕЕ от pH универсального буфера

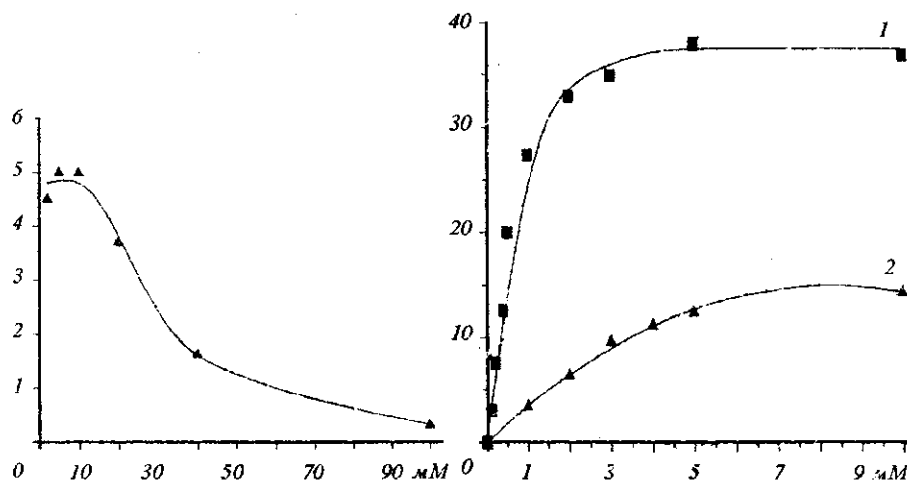


Рис. 3. Зависимость величины сигнала биосенсора на 0,1 мМ ВАЕЕ от концентрации фосфатного буфера (рН 7,0). Здесь и на рис. 4 по оси ординат — величина сигнала, мВ
Рис. 4. Зависимость величины сигнала биосенсора от концентрации субстрата ВАЕЕ в растворе: 1 — в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,0); 2 — в универсальном буфере (рН 7,0)

активности фермента, иммобилизованного в белковую матрицу с помощью ГА. Как видно из рис. 2, сдвиг величины рН исследуемого раствора на единицу от области рН-оптимума в кислую или щелочную сторону в значительной степени сказывается на интенсивности сигнала и может уменьшить его в два раза. Таким образом, проведение измерений в биологических жидкостях должно предусматривать предварительное разведение в буфере с достаточной буферной емкостью и определенным значением рН.

В связи с этим была изучена зависимость величины отклика биосенсора от концентрации буфера. Из данных рис. 3 следует, что увеличение концентрации фосфатного буфера (рН 7,0) выше 10 мМ вызывает значительное уменьшение сигнала. В случае этого буфера такая концентрация является оптимальной для проведения измерений, так как при более низких концентрациях величина сигнала существенно не изменяется, в то время как буферная емкость раствора падает. В зависимости от состава и буферной емкости среды измерения меняется диапазон измеряемых концентраций анализируемого субстрата. На рис. 4 приведены две калибровочные кривые трипсинового сенсора, снятые в 10 мМ фосфатном буфере с рН 7,0 (1) и в универсальном буфере с рН 7,0 (2). Область линейной зависимости величины сигнала сенсора от концентрации субстрата в первом случае — 0,2—2,0 мМ, а во втором — 0,5—5,0 мМ. Такой сдвиг диапазона может быть связан с более высокой буферной емкостью универсального буфера.

Для биологических жидкостей характерными являются высокие концентрации различных солей. В связи с этим представляло интерес выяснить влияние на величину отклика биосенсора присутствия в анализируемом растворе различных концентраций NaCl (одна из основных солей, содержащаяся в биологических жидкостях). Как можно видеть из графика, величина сигнала в значительной степени зависит от концентрации NaCl в исследуемом растворе (рис. 5). Увеличение концентрации соли от 0 до 150 мМ приводит к падению величины сигнала более чем в 2,0—2,5 раза. При дальнейшем возрастании концентрации NaCl сигнал стабилизируется. Таким образом, при проведении измерений в биологических жидкостях можно

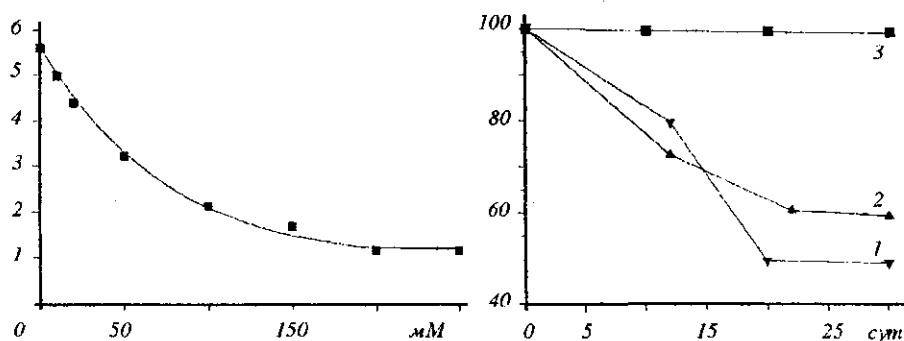


Рис. 5. Зависимость величины сигнала биосенсора на 0,1 мМ ВАЕЕ от концентрации NaCl в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,0). По оси ординат — величина сигнала, мВ

Рис. 6. Изучение стабильности сигнала биосенсора при хранении в различных условиях: 1 — в сухом виде при комнатной температуре; 2 — в сухом виде при 4 °С; 3 — в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,0) при 4 °С. Измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,0) при концентрации ВАЕЕ в пробе 0,1 мМ. По оси ординат — величина сигнала, %

существенно снизить влияние концентрации солей, если в исходный буфер, в котором будет выписываться базовая линия показаний сенсора, добавлять NaCl в концентрации не ниже 200 мМ. Тогда последующее изменение концентрации соли в исследуемой пробе, вызванное добавлением анализируемой жидкости, не будет влиять на величину отклика биосенсора и вносить ошибку в определение.

Было также исследовано действие температуры на показания сенсора. После инкубации последнего при температуре 60 °С в течение 30 мин уменьшение сигнала составило всего около 10 %. Эти результаты позволяют заключить, что сенсор достаточно термостабилен, и колебания температуры в процессе измерения не будут существенно сказываться на величине сигнала.

Практическое применение сенсора предполагает возможность его длительного хранения. В соответствии с этим проверяли активность сенсора при хранении в разных условиях в течение месяца. Полученные данные представлены на рис. 6. Показано изменение величины отклика сенсора на одинаковые концентрации субстрата при хранении в сухом виде при комнатной температуре (кривая 1), в сухом виде при 4 °С (кривая 2), в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,5) при температуре 4 °С. В последнем случае сенсор в течение месяца сохранял 100 %-ную активность, в то время как хранение в сухом виде при комнатной температуре вызывало существенное падение его активности уже в первые 10 дней.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что созданная модель энзимобиосенсора на основе pH-чувствительных полевых транзисторов и фермента трипсина можно использовать для определения концентрации модельного субстрата ВАЕЕ в буфере в диапазоне 0,2—5,0 мМ. Оптимальными условиями для проведения таких измерений являются pH 7,0—7,5, концентрация исходного буфера не выше 10 мМ, отсутствие NaCl. При хранении устройства в соответствующем буфере при температуре 4 °С его показания стабильны в течение месяца.

Модель перспективна в плане дальнейшей разработки сенсора для определения общего белка в биологических жидкостях. Однако при переходе к измерениям в биологических жидкостях необходимо учесть, что

результаты определения могут сильно зависеть от концентрации, солевого состава и рН исходной буферной среды. Влияние этих факторов можно существенно уменьшить, если при снятии калибровочных кривых для сенсора использовать буфер с достаточно высокой буферной емкостью (10 мМ и более) и рН 7,0—7,5, содержащей NaCl в концентрации не ниже 200 мМ, в который затем добавлять определенное количество анализируемой жидкости. При таких условиях рН и солевой состав анализируемой жидкости не будут оказывать существенного влияния на результаты определения.

О. О. Білован, О. П. Солдаткін, Н. Ф. Стародуб, Г. В. Єльська

Протеолітичний біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів

Резюме

Створено модель біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів і фермента трипсина, який може стати базою при створенні біосенсора для визначення концентрації загального білка у біологічних рідинах. Подібрано оптимальні умови проведення вимірів, вивчено стабільність і точність його роботи. Макет дозволяє знаходити концентрацію штучного субстрата Na-бензоїл-аргінін-етилового ефіру в діапазоні 0,2—2,0 мМ в 10 мМ фосфорному буфері (рН 7,0) і 0,5—5,0 мМ в універсальному буфері (рН 7,0). Встановлено значну залежність величини відгуку сенсора від рН, буферної ємності та іонної сили робочого буфера. Показання сенсора досить стабільні до коливань температури і практично не змінюються протягом місяця при його зберіганні в буферному розчині при 4 °С. Отримані результати обговорюються з точки зору проблеми визначення концентрації загального білка в біологічних рідинах.

O. A. Beloivan, A. P. Soldatkin, N. F. Starodub, A. V. Et'skaya

A proteolytic biosensor based on a pH-sensitive field effect transistor. 1. Investigation of operation in model solutions

Summary

The laboratory prototype of biosensor has been fabricated on the basis of trypsin immobilized on the gate surface of pH-sensitive field effect transistor which should be useful for detection of the total protein concentration in biological fluids. The optimal conditions to provide measurements have been determined. The characteristics of its operation stability and accuracy in a model system have been obtained. The biosensor prototype can measure concentrations of Na-benzoyl-arginin ethyl ester in the range of 0.2–5.0 mM. The effects of pH, buffer capacity and ionic strength on the response of the biosensor have been investigated. All the results have been discussed in frame of the problem of detecting total protein concentration in biological fluids.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Fu H., Anzai J., Osa T., Matsuo T.* Proteolytic enzyme sensors using an ion-sensitive field effect transistor // *Chem. Pharm. Bull.*—1988.—36, N 3.—P. 1190
2. *Shulga A. A., Strikha V.I., Soldatkin A. P., Et'skaya A. V. et al.* Removing the influence of buffer concentration on the response of enzyme field effect transistor by using additional membranes // *Anal. Chim. Acta.*—1993.—278.—P. 234.

УДК 541.13:577.15

Поступила в редакцію 09.10.95