

Біосенсори на основі холінестераз для аналізу пестицидів, іонів важких металів та гіпохлориту

О. П. Солдаткін

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

Розроблено ферментні біосенсори на основі холінестераз та електрохімічних перетворювачів для аналізу пестицидів, іонів важких металів та гіпохлориту в водних розчинах. Біоселективні мембрани на поверхні перетворювачів отримували іммобілізацією холінестераз у білковій мембрані за допомогою поперечної зшивки ферментів з білком-носієм (бичачим сироватковим альбуміном) у насичених парах глутарового альдегіду. Визначено оптимальні умови функціонування та основні характеристики розроблених ферментних сенсорів.

Вступ. На сьогодні у народному господарстві використовується багато різноманітних хімічних речовин, частина з яких може утворювати стійкі токсичні комплекси. Це призводить до забруднення води, повітря та ґрунтів і є надзвичайно шкідливим як для людей, так і тварин. Очевидно, що концентрації токсичних агентів повинні строго контролюватися у продуктах харчування та питній воді. Фосфорорганічні пестициди, важкі метали та гіпохлорит є представниками подібних забруднювачів.

Класичні методи, що традиційно застосовуються в лабораторіях якості води для визначення гіпохлориту, пестицидів та іонів важких металів, характеризуються кількома етапами, використанням шкідливих реагентів та значним терміном обладнання, що значно підвищує вартість аналізу. Тому створення дешевих, простих, точних та селективних аналітичних систем на основі біосенсорів для визначення токсичних забруднювачів навколишнього середовища є дуже актуальним.

У даній публікації пропонується розробка ферментних сенсорів на основі холінестераз та потенціометричних і кондуктометричних перетворювачів для аналізу органофосфорних пестицидів, іонів важких металів та гіпохлориту в водних розчинах.

Матеріали і методи. Ацетилхолінестераза (АХЕ) (ЕС 3.1.1.7) із електричного вугря з ак-

тивністю 225 од. акт./мг, бутирилхолінестераза (БХЕ) (ЕС 3.1.1.8) із сироватки коня з активністю 266 од. акт./мг, бичачий сироватковий альбумін (БСА), ацетилхолінхлорид, бутирилхолінхлорид, діізопропілфторфосфат (ДФФ) та піридин-2-альдоксимметилйодид (ПАМ-2) було отримано з фірми «Sigma» (США), гіпохлорит натрію — з «Aldrich» (США), трис, натрієва сіль ЕДТА та 25 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) — з «Merck» (ФРН). Солі важких металів та всі інші реактиви були вітчизняного виробництва з кваліфікацією «осч» та «хч». Дистильована та бідистильована вода використовувалася для приготування аналітичних зразків, буферів та інших розчинів.

Іммобілізація ферменту. Мембрану, що містила іммобілізований фермент, та референтну формували наступним методом. Краплю розчину, що містив 3,6 % АХЕ чи 5 % БХЕ, 5 % БСА та 10 % гліцерин у 10—20 мМ фосфатному буфері, рН 7,5 (у випадку сенсора для визначення іонів важких металів використовували 5 мМ трис- HNO_3 буфер, рН 7,5), наносили на чутливу область одного з двох рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) диференційної пари. На інший рН-ПТ цієї ж пари (контрольний) наносили краплю суміші, яка містила 10 % БСА і 10 % гліцерин у тому ж самому буфері. Біоселективні мембрани наносили на кондуктометричні перетворювачі аналогічним чином. Після цього сенсорний чип вмішували на 30 хв в насичені пари глутарового альдегіду, а потім про-

сушували при кімнатній температурі протягом 15—20 хв.

Конструкція сенсора та схема вимірювання. Використано напівпровідникові структури, на кожній з яких розміщена диференційна пара рН-ПТ чи кондуктометричних гребінчастих електродів. Конструкція, спосіб упаковки чипів та схеми вимірювання наведено в роботах [3, 4].

Процедура вимірювання концентрацій субстрата та інгібіторів. Сенсорний чип занурювали в комірку з робочим буфером і вимочували протягом кількох хвилин для врівноваження мембранної системи та отримання стабільної базової лінії. Чутливість біосенсора до концентрацій субстрата (ацетилхоліну чи бутирилхоліну) вимірювали при кімнатній температурі і інтенсивному перемішуванні. Концентрацію субстрата змінювали в комірці, додаючи різні порції 50 мМ аналіту. Неспецифічні зміни, пов'язані з коливаннями температури, рН та електричними наведеннями, які могли мати місце в аналізованому зразку, пригнічували завдяки використанню диференційної схеми вимірювань [3, 4].

Процедура біосенсорного визначення концентрації інгібіторів була складнішою і включала такі етапи:

1. Вимочування в робочому буфері (фосфатному чи трис- HNO_3 , рН 7,2—7,5) протягом кількох хвилин для врівноваження мембранної системи та отримання стабільного базового сигналу.

2. Ацетилхолін (чи бутирилхолін) додавали у комірку до концентрації 0,25 мМ. Відповідний кінетичний чи стаціонарний відгук біосенсора на концентрацію субстрата слугував показником каталітичної активності іммобілізованого ферменту і використовувався в наступних розрахунках для оцінки ефекту пригнічення ферменту відповідними концентраціями інгібітора.

3. Після відмивки сенсора від субстрата відповідним робочим буфером останній занурювали в розчин аналізованого інгібітора в дистильованій воді (рН 6,0—6,5) на певний термін.

4. Після інтенсивної відмивки біосенсора робочим буфером протягом 2—3 хв відповідний кінетичний чи стаціонарний відгук біосенсора на концентрацію субстрата визначали, як у пункті 2.

Ступінь пригнічення ферменту оцінювали, порівнюючи відгуки біосенсора на 0,25 мМ концентрацію субстрата до і після інкубації сенсора в аналізованому розчині інгібітора. Сенсор реактивували, використовуючи 10 мМ розчин ЕДТА (у випадку інгібування іонами важких металів [4]) чи 0,1 мМ ПАМ-2 (інгібування органіфосфорними пестицидами [5]) у робочому буфері.

Результати та обговорення. В основі роботи ферментного сенсора на основі рН-ПТ лежить реєстрація локальної зміни рН у мембрані, що містить фермент, яка відбувається за рахунок ферментативних реакцій і пропорційна концентрації субстрата в аналізованій пробі. У випадку кондуктометричного перетворювача реєструється локальна зміна провідності в мембрані як результат проходження тих же ферментативних реакцій. Холінестерази каталізують розщеплення ацетилхоліну та бутирилхоліну до холіну та оцтової чи масляної кислоти і таким чином локально закислюють середовище та змінюють провідність у мембрані. Ці ферменти можуть бути основою при створенні потенціометричних та кондуктометричних сенсорів і використовуватися для прямого аналізу субстратів [6]. У свою чергу відомо, що холінестерази чутливі до фосфорорганічних пестицидів та іонів важких металів як інгібіторів [5], тому сенсори на основі цих ферментів можуть використовуватися і в інгібіторному аналізі [7, 8].

Визначення ацетилхоліну. У попередніх експериментах вивчали оптимальні умови роботи сенсора на основі АХЕ та рН-ПТ. Так, було отримано калібрувальні криві АХЕ біосенсора при визначенні концентрацій ацетилхоліну. Виміри проводили в стаціонарному режимі. Як видно з рис. 1, лінійний динамічний діапазон біосенсора при аналізі ацетилхоліну знаходився між 0,02 і 1,0 мМ концентраціями субстрата при визначеннях у режимі максимальних відгуків.

Визначення пестицидів. Ацетилхолінестераза містить в активному центрі залишок серину, який бере участь у каталітичному розщепленні ацетилхоліну. Органофосфорні пестициди можуть зв'язуватися з цим залишком серину, інактивуючи фермент необоротно. Відмивка сенсора робочим буфером не відновлювала активності ферменту. Лише використання ПАМ-2 як реактиватора холінестераз призводило до відновлення активності ферменту [5].

ДФФ, один із представників органіфосфорних пестицидів, є класичним інгібітором холінестераз. У даній публікації зроблено спробу визначення пестицидів (на прикладі ДФФ) за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази та рН-ПТ. Датчик занурювали в розчин, що містить інгібітор, і витримували протягом різних термінів. Було показано, що при збільшенні часу інкубації сенсора з інгібітором величина відгуку падала і відповідно зростала чутливість сенсора до концентрацій інгібітора. Так, вибираючи час інкубації, можна регулювати чутливість біосенсора до ДФФ. Але значне збільшення часу передінкубації призводить до

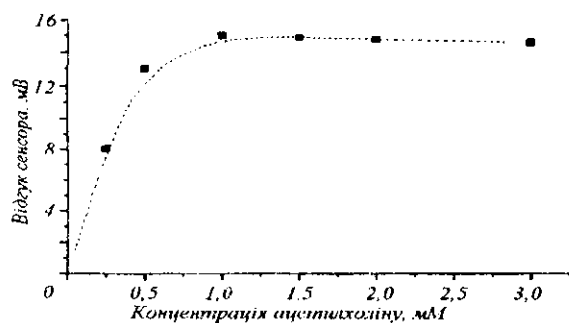


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення ацетилхоліну. Виміри здійснювали в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при інтенсивному перемішуванні та кімнатній температурі

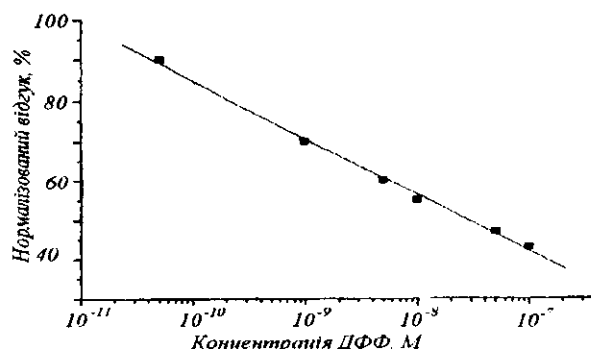


Рис. 2. Калібрувальна крива для визначення ДФФ. Виміри здійснювали в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при інтенсивному перемішуванні та кімнатній температурі

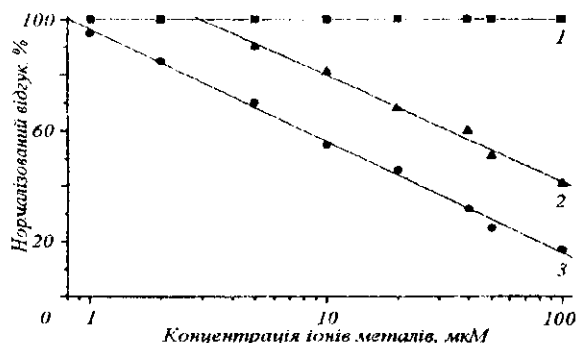


Рис. 3. Калібрувальні криві для визначення концентрацій солей важких металів: 1 — інгібування солями $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, чи $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, чи $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, чи $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, чи $\text{Ag}(\text{NO}_3)$; 2 — $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 3 — $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Виміри відгуків сенсора і відповідно залишкової активності іммобілізованої БХЕ (%) здійснювали в 10 мМ трис- HNO_3 буфері, рН 7,5, при інтенсивному перемішуванні та кімнатній температурі

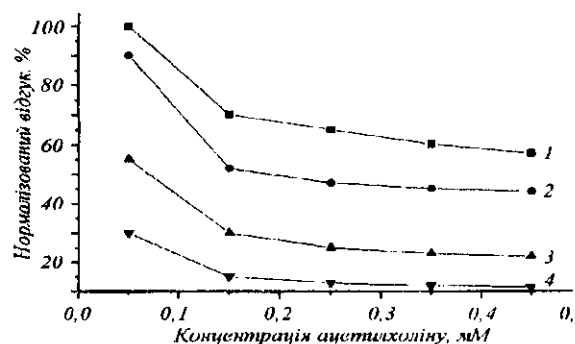


Рис. 4. Залишкова активність ацетилхолінестерази після внесення 100 мкМ NaOCl протягом різного часу: 1 — без інгібування; 2 — 10; 3 — 20; 4 — 30; 5 — 45; 6 — 60 хв. Виміри здійснювали в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при інтенсивному перемішуванні та кімнатній температурі

суттєвого зростання загального часу аналізу. Тому необхідно вибирати якусь оптимальну величину. В даному аналізі обрано час інкубації біосенсора з інгібітором 10 хв. Калібрувальна крива для визначення цього пестициду за допомогою біосенсора представлена на рис. 2. Мінімальна концентрація ДФФ, що може бути визначена за допомогою отриманої калібрувальної кривої, складала 10^{10} М. Отримана чутливість аналізу була вищою, ніж у випадку визначення ДФФ класичними методами.

Повторне застосування сенсорного чипа для визначення ДФФ було можливим за умови використання реактиватора ПАМ-2 для відмивки сенсора.

Було показано, що після реактивації сенсорний відгук може відновлюватися майже повністю, а біосенсор такого типу можна повторно використовувати кілька разів [5—7]. Відхилення між вимірами не перевищувало 10 %.

Визначення іонів важких металів. Бутирилхолінестераза, іммобілізована на поверхні селективних детекторів, використана при розробці біосенсорів для визначення концентрації бутирилхолінхлориду та вивчення ефектів інгібування пестицидами [6, 7]. Подібний підхід було застосовано у даній роботі для селективного визначення іонів важких металів у водному розчині.

Калібрувальні криві для аналізу іонів важких металів кондуктометричним біосенсором представлені на рис. 3. Як видно, тільки Hg^{2+} та Pb^{2+} у концентраціях, нижчих за 100 мкМ, сильно пригнічують ферментативну активність БХЕ. Інші іони, які тестувалися, не виявляли помітного впливу на ферментативну активність у цих же концентраціях. Показано, що пригнічення бутирилхолінестерази іонами ртуті та свинцю є необоротним, як і у випадку уреазі та алкогольоксидази [4, 9].

Повторне використання сенсорного чипа для визначення іонів важких металів було можливим тільки після реактивації іммобілізованої БХЕ за допомогою ЕДТА [4, 9]. Відхилення між вимірами не перевищувало 15 %.

Визначення гіпохлориту. Інгібіторний тест показав, що максимальний рівень сигналу біосенсора та швидкість його наростання при аналізі ацетилхоліну зменшувалися при попередній обробці сенсора розчином гіпохлориту, а ступінь інгібування ферменту суттєво залежав від терміну інкубації з інгібітором (рис. 4). Так, при інкубації АХЕ сенсора у 0,1 мМ розчині NaOCl протягом 45 хв 80–90 % відгуку інгібувалося. Крім того, чим вищою була концентрація гіпохлориту, тим швидшим був інгібіторний ефект. Як можна бачити з рис. 4, ступінь пригнічення залежить також від концентрації субстрата. Максимальний інгібіторний ефект гіпохлориту на відгук АХЕ сенсора був виявлений для концентрації ацетилхоліну 0,25 мМ і вище.

Залежність відгуку біосенсора від концентрації NaOCl представлено на рис. 5 (стаціонарний режим вимірювань). Час інкубації сенсора в розчині, який містив гіпохлорит, становив 20 хв. Відгуки сенсора на 0,25 мМ концентрацію ацетилхоліну вимірювали в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Мінімально детектована концентрація гіпохлориту становила 0,01 мМ. Ці дані добре корелюють з результатами, отриманими при інактивації клітин *E. coli* гіпохлоритом [10]. Але при необхідності мінімально детектовану концентрацію інгібітора можна зменшити, збільшуючи час інкубації біосенсора в аналізованому зразку, який містить гіпохлорит (див. рис. 4).

ПАМ-2 — відомий реактиватор активності холінестераз після їх інактивації фосфорорганічними сполуками [5, 7] — в нашому випадку не відновлював активності біосенсора. Після обробки АХЕ сенсора 0,1 мМ ПАМ-2 протягом 30–40 хв біосенсор не відновлював активності, пригніченої гіпохлоритом. Цей факт може бути використаний як основа для висновку стосовно того, що механізм інгібування АХЕ гіпохлоритом відрізняється від такого фосфорорганічними пестицидами.

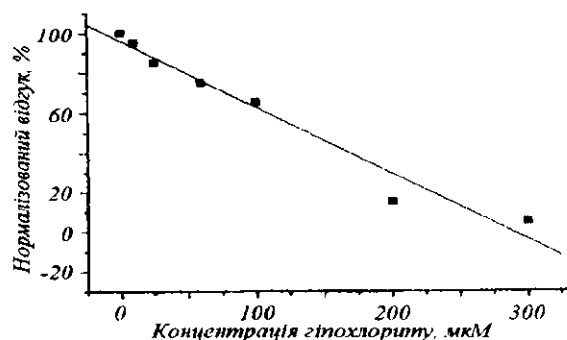


Рис. 5. Калібрувальна крива для визначення концентрацій NaOCl при вимірах в режимі стаціонарних відгуків. Виміри відгуків сенсора і відповідно залишкової активності іммобілізованої БХЕ (%) здійснювали при концентрації ацетилхолінхлориду 0,25 мМ в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при інтенсивному перемішуванні та кімнатній температурі

Вивчення селективності гіпохлоритчутливого АХЕ сенсора та механізму пригнічення холінестерази гіпохлоритом є наступним етапом представлених досліджень.

Таким чином, на основі наведених результатів можна зробити такі висновки. Було створено потенціометричні та кондуктометричні ферментні сенсори на основі холінестераз, чутливі до ацетилхоліну та бутирилхоліну. На базі цих сенсорів розроблено біохімічну процедуру визначення органіфосфорних пестицидів, іонів важких металів та гіпохлориту в водних розчинах. Основні робочі характеристики розроблених сенсорів на основі холінестераз представлено нижче:

Мінімально детектована концентрація складає 10^{-10} М для ДФФ, 10^{-6} М для іонів ртуті, $5 \cdot 10^{-6}$ М для іонів свинцю та 10^{-5} М для гіпохлориту (значення рН для інгібіторного розчину становило 6,0–6,5). Величина інгібіторного впливу на біосенсор залежить від концентрації субстрата та терміну експозиції сенсора в розчині інгібітора, що може бути використано відповідно для підвищення чутливості сенсорів при аналізі інгібіторів.

Необхідно відмітити, що сенсор на основі АХЕ продемонстрував здатність до реактивації 10^{-4} М концентрацією ПАМ-2 після інгібування пестицидами і відсутність такої у випадку інгібування гіпохлоритом, що свідчить про різні механізми, які лежать в основі пригнічення. Сенсор на основі БХЕ

Основні робочі характеристики біосенсорів на основі холінестераз

Пряме визначення ацетилхоліну (АХЕ сенсор)

Режим визначення	Стаціонарний відгук
Лінійний динамічний діапазон	0,02—0,5 мМ
Час відгуку	1—2 хв
Тривалість аналізу	2—3 хв
Операційна стабільність	8 год

Інгібіторний аналіз діізопропілфторфосфату (АХЕ сенсор)

Режим визначення	Стаціонарний відгук
Лінійний динамічний діапазон	10^{-10} — 10^{-7} М
Час відгуку	1—2 хв
Тривалість аналізу, включаючи інкубацію з інгібітором	15 хв
Операційна стабільність	5—7 раз

Інгібіторний аналіз Hg^{2+} та Pb^{2+} (БХЕ сенсор)

Режим визначення	Стаціонарний відгук
Лінійний динамічний діапазон	10^{-6} — 10^{-4} М (для Hg^{2+}) $5 \cdot 10^{-6}$ — 10^{-4} М (для Pb^{2+})
Час відгуку	1—2 хв
Тривалість аналізу, включаючи інкубацію з інгібітором	15 хв
Операційна стабільність	10—15 аналізів

Інгібіторний аналіз гіпохлориту (АХЕ сенсор)

Режим визначення	Кінетичний/Стаціонарний відгук
Лінійний динамічний діапазон	10^{-5} — 10^{-4} М
Час відгуку	20 с/1—2 хв
Тривалість аналізу, включаючи передінкубацію	25 хв
Операційна стабільність	Одноразове використання

був чутливим до реактивації ЕДТА після інгібування іонами важких металів. Виявлений феномен різної чутливості біосенсорів, пригнічуваних різними інгібіторами, до реактиваторів може бути використано як тест селективності при аналізі неві-

домих зразків водних розчинів, щоб розділити ефекти інгібування сенсорів фосфорорганічними пестицидами, іонами важких металів та гіпохлоритом.

Частина цієї роботи було виконано завдяки фінансовій підтримці Міністерства у справах науки

та технологій (проект № 5.4/74 Державного фонду фундаментальних досліджень).

А. П. Солдаткин

Биосенсоры на основе холинэстераз для анализа пестицидов, ионов тяжелых металлов и гипохлорита

Резюме

Разработаны ферментные биосенсоры на основе холинэстераз и электрохимических преобразователей для анализа пестицидов, ионов тяжелых металлов и гипохлорита в водных растворах. Биоселективные мембраны на поверхности преобразователей получили иммобилизацией холинэстераз в белковой мембране с помощью поперечной сшивки ферментов с белком-носителем (бычьим сывороточным альбумином) глутаровым альдегидом. Определены оптимальные условия работы разработанных ферментных сенсоров и изучены их основные рабочие характеристики.

A. P. Soldatkin

Biosensors based on cholinesterases for the analysis of pesticides, heavy metal ions and hypochlorite species

Summary

The enzyme biosensors based on cholinesterases and electrochemical transducers were developed for the analysis of pesticides, heavy metal ions and hypochlorite species in water solutions. Bioselective membranes on the transducers surface were formed by cross-linking of cholinesterases with bovine serum albumin in saturated glutaraldehyde vapour. Working characteristics of the biosensors developed were studied and optimized.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Handbook of analytical chemistry* / Ed. L. Meites.—New York etc.: McGraw-Hill Book Company, 1963.

2. Baylocq-Ferrier D., Baillet-Guffroy A., Pellerin F. Methodes generales d'analyse quantitative. Titration par iodometrie // *Traite: Analyse et Caracterisation* / Ed. C. Genty.—Paris: Techniques de l'Ingenieur, 1995.—P. 330-1—330-8.
3. Shul'ga A. A., Netchiporuk L. I., Sandrovsky A. K. et al. ISFET operation with non-isolated substrate directly exposed to the solution, the Nu-substrate ISFET // *Sensors and Actuators*.—1995.—30.—P. 101—105.
4. Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I. et al. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination // *Ibid.*—24—25.—P. 145—148.
5. Tran-Minh C. Immobilised enzyme probes for determining inhibitors // *Ion-Selecc. Electrode Rev.*—1985.—7.—P. 41—75.
6. Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. et al. Enzyme biosensor based on a micromachined interdigitated conductometric transducer: application to the detection of urea, glucose, acetyl- and butyrylcholine chlorides // *Sensors and Actuators B*.—1994.—21.—P. 123—129.
7. Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. et al. Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilised cholinesterases // *Anal. chim. acta.*—1993.—281.—P. 3—11.
8. Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Soldatkin A. P. et al. Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides // *Electroanalysis*.—1994.—6.—P. 752—758.
9. Korpan Y. I., Soldatkin A. P., Gonchar M. V. et al. A novel enzyme biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive field effect transistors // *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*—1997.—68, № 2.—P. 209—213.
10. Albrich J. M., Hurst J. K. Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid // *FEBS Lett.*—1982.—144, № 1.—P. 157—161.

Надійшла до редакції 30.10.97