

Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора

О. О. Солдаткін, О. А. Назаренко, О. С. Павлюченко¹, О. Л. Кукла¹,
В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін, Г. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України
Просп. Науки, 41, Київ, 03028, Україна

alex_sold@yahoo.com

Розроблено високочутливий та селективний мультибіосенсор на основі низки іммобілізованих ферментів як біоселективних елементів та матриці іоноселективних польових транзисторів – перетворювачів біохімічного сигналу в електричний. Для створення біоселективних елементів мультибіосенсора використано ферменти ацетилхолінестеразу, бутирилхолінестеразу, уреазу, глюкозооксидазу та триферментну систему (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза). Отримані біоселективні елементи в прямому ферментному аналізі демонструють високу чутливість до відповідних субстратів. Час проведення аналізу складає 10 хв. Динамічний діапазон визначення субстратів значною мірою залежить від застосованих ферментних систем і знаходиться в межах від 0,1 мМ до 1,5–10 мМ. Досліджено також залежності відгуків мультибіосенсора від рН, іонної сили та буферної ємності розчину. Підібрано оптимальні умови для одночасної роботи всіх біоселективних елементів мультибіосенсора, наведено дані з перехресного впливу субстратів усіх використаних ферментів. Розробленому мультианалізатору притаманна задовільна відтворюваність сигналів.

Ключові слова: мультибіосенсор, іммобілізовані ферменти, іоноселективні польові транзистори, глюкозооксидаза, прямий аналіз субстратів, інгібіторний аналіз.

Вступ. З кожним роком екологічний моніторинг довкілля набуває все більшого поширення в усьому світі [1]. Це пов'язано зі значним розвитком хімічної промисловості, інтенсивним використанням хімічних препаратів у сільському господарстві та збільшенням застосування різноманітних продуктів хімії в інших галузях діяльності людини. Зазначені речовини, які часто є токсичними, забруднюють великі території, потрапляючи в повітря, землю, воду та в продукти харчування лю-

дей і сільськогосподарських тварин. Це, в свою чергу, призводить до погіршення самопочуття людей і виникнення різних захворювань [2].

Загальновідомо, що серед токсичних речовин – забруднювачів навколишнього середовища, особливе місце належить важким металам і пестицидам. Важким металам та їхнім сполукам притаманні відносно висока стійкість до деградації у довкіллі, розчинність в атмосферних опадах, здатність до сорбції ґрунтами і акумуляцією рослинами. Вони можуть накопичуватися в організмах, є отруйними для людини та відрізняються широким спектром і різноманітним проявом шкідливих впливів [3].

Поряд з важкими металами забруднення пестицидами є ще одним фактором високого ризику для здоров'я людини [4, 5]. Стійкі до розпаду токсичні сполуки фосфороорганічних пестицидів, які і в наш час досить широко використовують у деяких країнах світу в сільському господарстві, та їхні не менш токсичні залишки [6] характеризуються високим ступенем проникнення і потрапляють у продукти харчування людей [7].

У зв'язку з вищевикладеним постійний ефективний контроль наявності цих токсинів (перевищення допустимих концентрацій) у навколишньому середовищі та продуктах споживання є необхідним для охорони природи та покращення якості життя [8]. Сучасні стандартні методи високоточного визначення токсичних речовин, а саме – газова та рідинна хроматографія, спектрофотометрія, різноманітні хімічні та фізичні методи – потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання [9, 10]. Ще одним недоліком згаданих традиційних методів аналізу є необхідність у складній попередній підготовці проб, наслідком чого є значні затрати часу.

Альтернативою вирішення зазначених вище проблем є використання біосенсорів – нових біоаналітичних приладів. На цей час вже розроблено низку монобіосенсорів для визначення різних токсичних речовин. Деякі з них розроблено для прямого ферментного [11], інші – для інгібіторного аналізу [12]. Але їх можна використовувати лише для визначення однієї токсичної речовини або класу токсичних сполук. На даному етапі запропоновано концепцію мультибіосенсора для використання в екологічному моніторингу та показано принципову можливість його створення [6]. Уже існує кілька лабораторних прототипів мультибіосенсорних приладів з різними типами перетворювачів [13, 14].

Але найперспективнішим, на наш погляд, є створення мультибіосенсора на основі кількох іммобілізованих ферментів (або каскадів ферментів) та матриці іоноселективних польових транзисторів (ІСПТ) з використанням інгібіторного аналізу токсичних речовин, що дотепер ще не застосовували.

У представленому дослідженні розпочато роботи з розробки ферментного мультибіосенсора для

інгібіторного визначення різноманітних токсичних речовин. Для створення біоселективних елементів мультибіосенсора запропоновано використати найпридатніші, на нашу думку, ферменти: ацетилхолінестеразу, бутирилхолінестеразу, уреазу, глюкозооксидазу та триферментну систему з інвертази, мутаротази та глюкозооксидази. Використання зазначених ферментів дозволить селективно визначати такі токсичні речовини, як фосфороорганічні та карбаматні пестициди, іони важких металів. Першими етапами розробки мультибіосенсора, представленими у цій роботі, є вибір спільного (оптимального для перелічених ферментів) методу іммобілізації, підбір найкращих умов для їхньої одночасної роботи, тестування на взаємний вплив субстратів і перевірка можливості використання даного мультибіосенсора для прямого аналізу відповідних субстратів.

Матеріали і методи. У дослідженнях застосовано препарати ліофілізованих ферментів: уреазу з бобів сої активністю 31 од. акт/мг фірми «Fluka» (Швейцарія); ацетилхолінестеразу (АцХЕ) з електричного вугря активністю 292 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США); бутирилхолінестеразу (БуХЕ) із сироватки крові коня активністю 13 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie», глюкозооксидазу (ГОД) з *Penicillium vitale* активністю 130 од. акт/мг фірми «Діагностикум» (Україна); інвертази з пекарських дріжджів активністю 355 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie»; мутаротази з нирки свині активністю 100 од. акт/мг фірми «Biozyme Laboratories Ltd» (Велика Британія). Бічачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) отримано від фірми «Sigma-Aldrich Chemie». Як субстрати використовували сечовину, БуХЕ, АцХЕ, глюкозу та цукрозу. Робочим буфером слугував фосфатний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$). Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні сполуки, використані в роботі, вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

Виготовлення біоселективних мембран. Для виготовлення робочих біоселективних елементів на основі АцХЕ, БуХЕ, уреазу та ГОД готували розчини такого складу: 5 % фермент + 5 % БСА, а для триферментної системи – 3 % інвертази + 2 % мута-

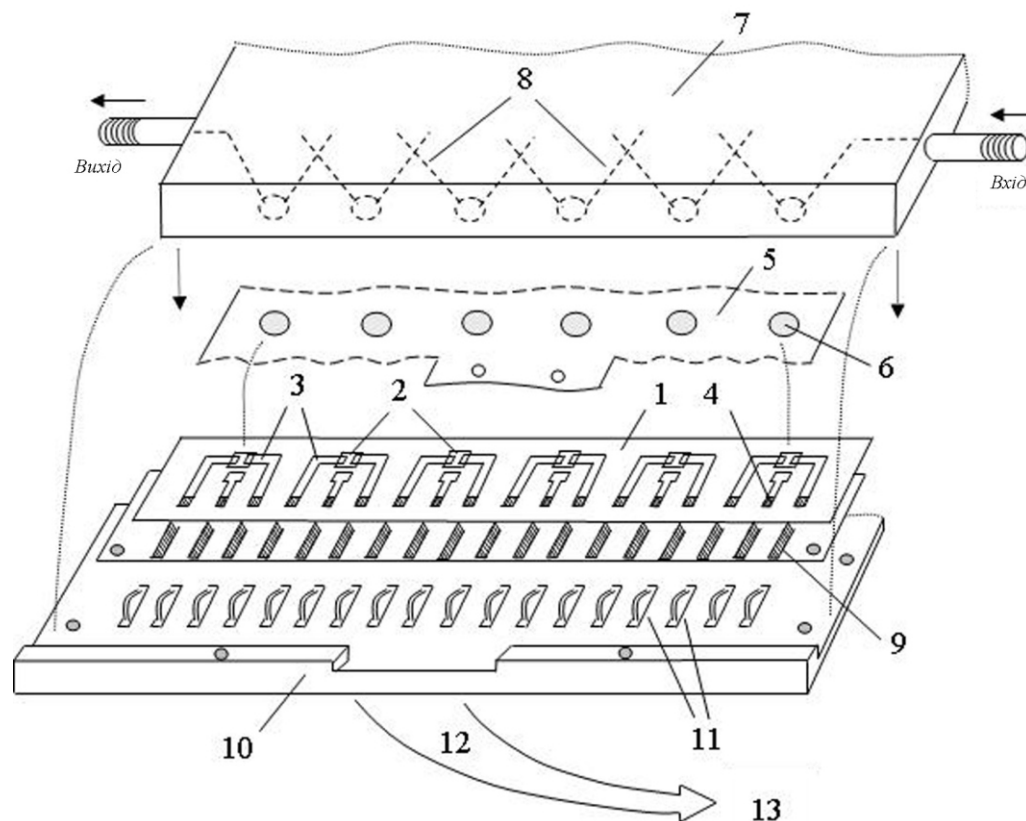


Рис. 1. Схематичний вигляд складових частин багатоканального мультибіосенсора: 1 – інтегральна кремнієва лінійка з шестиелементним масивом іоноселективних польових транзисторів; 2 – області транзисторних затворів з рН-чутливим поверхневим шаром з нітриду кремнію; 3 – дифузійні низькоомні шини, за допомогою яких контакти до виточу та стоку транзисторів виведено на край пластини; 4 – додаткова контактна шина до вбудованого електрода порівняння; 5 – гумове ущільнення; 6 – отвори в гумовій смужці для рідинного контакту з активними ділянками затворів; 7 – притискна кришка з системою напуску та протоку рідини; 8 – система вбудованих зигзагоподібних проточних каналів зі входом та виходом протоку; 9 – проміжна монтажна плата контактування до виводів ІСПТ-елементів; 10 – фторопластовий корпус; 11 – вбудована система пружинних металевих контактів до відповідних виводів сенсорної лінійки; 12 – шина електричного з'єднання; 13 – багатоканальний блок сенсорних перетворювачів

ротаза + 4,5 % ГОД + 1,5 % БСА (далі – триферментний розчин). Наважки ферментів розчиняли у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 %-м гліцерином. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів брали БСА, кінцева концентрація якого складала 10 %. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів розчини для референтної і робочих мембран змішували з 1 %-м водним розчином ГА у співвідношенні 1:1. Отримані розчини зразу ж наносили на робочі частини перетворювачів за допомогою самплера «Eppendorf» (загальним об'ємом 0,1–2,5 мкл) до повного покриття робочої поверхні транзисторів, об'єм кожної з мембран складав ~0,1 мкл. Усі мембрани були з однаковим загаль-

ним вмістом білка. Далі мембрани висушували протягом 12 год на повітрі за кімнатної температури, а перед початком роботи їх відмивали від надлишку незв'язаного ГА.

Мультисенсорний прилад на основі ІСПТ. Прилад з 12-канальним інтегральним сенсорним масивом на основі іоноселективних (рН-чутливих) польових транзисторів, представлений на рис. 1, складається з двох незалежних шестиканальних сенсорних лінійок та включає чотири основних блоки: 1) блок проточної системи, виготовлений у формі двох незалежних проточних каналів з рідинним контактом для кожного окремого сенсора лінійки, яка має вхід і вихід для подачі розчину; 2) блок вимірювання сигналів, що складається з двох

сенсорних лінійок по шість ІСПТ; 3) 12-канальний електронний блок вимірювання вихідних сигналів від кожного ІСПТ; 4) інтерфейсний блок вводу–виводу даних на послідовний порт комп'ютера для обробки отриманих сигналів (на рис. не наведено).

Робота приладу ґрунтується на формуванні багатовимірного відгуку масиву електрохімічних сенсорів на основі ІСПТ з рН-чутливим шаром нітриду кремнію. Функціонує мультисенсор за рахунок вимірювання зміни поверхневого потенціалу на межі розподілу електроліт–затвор транзистора для кожного сенсорного елемента масиву одночасно з наступною обробкою вимірюваного масиву даних за допомогою спеціальних математичних методів і формування унікального хімічного образу зразка досліджуваної рідини.

Корпус матриці мультисенсора (2–6 см) на 12 каналів виготовляли з твердого ізолюючого матеріалу з низькою адсорбційною здатністю (фторопласт), який забезпечує відсутність вигину та має вбудовану систему рідкого потоку у вигляді зигзагоподібних каналів. Гідралічна система витримує хімічну дію кислот та лугів, має велику теплоємність і малу теплопровідність. Механічна частина забезпечує досить рівномірний прижим проточної системи до кремнієвої пластини через резинові ущільнення з фіксацією цього положення, що забезпечує безперешкодне протікання розчину через проточну систему за наявності чутливих мембран. Вихід проточної системи з'єднаний із зовнішнім електродом порівняння.

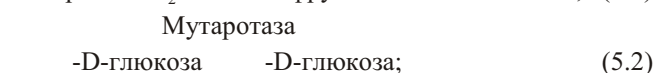
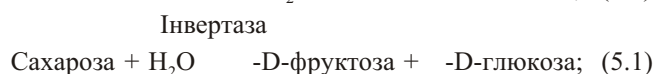
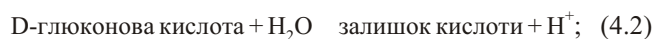
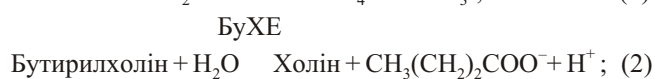
Електронна частина приладу складається з двох модулів. Модуль сенсорних перетворювачів на 12 каналів працює за схемою підтримання постійного струму каналу кожного ІСПТ, при цьому сигнал відгуку окремого сенсора формується в реальному масштабі часу у вигляді необхідного потенціалу на затворі транзистора. Модуль мікропрограмного управління виготовлено на основі восьмирозрядного мікроконтролера серії С51 і включає 12-канальний аналоговий комутатор, 12-розрядний послідовний аналогово-цифровий перетворювач та порт послідовного вводу–виводу даних у стандарті RS-232.

Методика вимірювання. Виміри проводили, в основному, у 2 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, за

кімнатної температури за допомогою проточної системи вимірювання. рН-оптимум роботи мультибіосенсора визначали в універсальному буфері, що містить суміш різних буферних розчинів (фосфорна, оцтова, борна кислоти з концентрацією 2,5 мМ) та має значення рН від 3,5 до 8,5 [15].

Концентрацію субстратів у комірці змінювали додаванням до робочого буфера порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстратів. Дослідження проводили щонайменше у трьох повторностях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричними перешкодами, нівелювали завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

Результати і обговорення. В основі роботи біоселективних елементів мультибіосенсора для прямого аналізу субстратів лежать такі одnofерментні реакції та каскади ферментативних реакцій:



Протікання реакцій (1–3) та каскадів реакцій (4, 5) супроводжується зміною концентрації протонів (відповідно локально змінюється величина рН розчину в мембрані). Це дозволяє використовувати матрицю ІСПТ як перетворювачі.

На рис. 2 представлено типові відгуки мультибіосенсора на внесення в аналізоване середовище

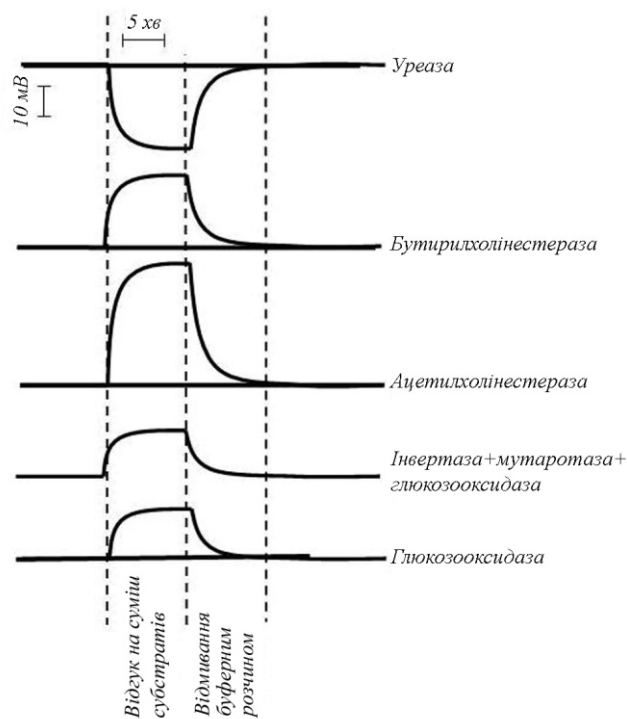


Рис. 2. Типові відгуки мультибіосенсора на внесення в аналізоване середовище суміші відповідних субстратів

суміші відповідних субстратів (10 мМ АцХ, 5 мМ БуХ, 5 мМ сечовина, 5 мМ цукроза та 2 мМ глюкоза). З цього рисунка видно, що відгуки мають різнонаправлений характер, а їхні значення відрізняються як за знаком, так і за абсолютною величиною. Причиною різнонаправленості відгуків є реакції, що лежать в їхній основі. Так, реакції (2–5) призводять до накопичення протонів (позитивний відгук), а реакція (1) – до їхнього поглинання (негативний відгук). Відмінність відгуків біосенсорних елементів за абсолютною величиною можна пояснити як різною активністю ферментів, так і залежністю деяких реакцій, зокрема (4, 5), від концентрації кисню, косубстрату в даних реакціях.

Калібрувальні криві, які характеризують роботу іммобілізованих на поверхні перетворювачів ферментів, наведено на рис. 3. Видно, що найбільшу чутливість відмічено у ферменту ацетилхолінестерази. Менш чутливими є бутирилхолінестераза та уреаза. У той же час глюкозооксидаза та триферментна система для визначення цукрози відзначалися найгіршою чутливістю відносно інших ферментів. Але чутливість усіх зазначених ферментних

мембран була достатньою для подальших експериментів. Також за отриманими калібрувальними кривими можна встановити динамічні діапазони визначення селективних ферментних елементів. Вони приблизно однакові за межею визначення, що складає від 0,1 мМ до 1,5–10 мМ. Але для подальших експериментів в інгібиторному аналізі будуть використані концентрації субстратів, за яких відгуки сенсорів стануть максимальними (при максимальному насиченні ферментів субстратами). Наприклад, для ГОД – це 2 мМ, а для уреази – 5 мМ.

В основі роботи іоноселективних польових транзисторів, як відомо, лежить вимірювання зміни рН аналізованого розчину, що може залежати і від самих ферментативних реакцій, і від характеристик розчину, в якому ці реакції проходять. Тому, перш за все, досліджували вплив параметрів розчину на величину відгуків нашого мультибіосенсора.

Однією з важливих характеристик буфера, що може модулювати величини відгуків біосенсорів на основі іоноселективних польових транзисторів, є іонна сила [16]. Щоб дослідити цей вплив, вимірювали величини відгуків біосенсорних елементів мультибіосенсора на внесення субстратів (10 мМ АцХ, 5 мМ БуХ, 5 мМ сечовини, 5 мМ цукрози та 2 мМ глюкози) залежно від концентрації КСІ (концентрацію КСІ змінювали від 1 до 40 мМ) (рис. 4). З отриманих графіків видно, що при збільшенні концентрації КСІ та відповідно іонної сили буфера відгуки на внесення субстратів зменшуються майже за однією експонентою, що забезпечує одночасну роботу вибраних ферментів з однаковою залежністю від іонної сили аналізованого зразка. З графіків також видно, що спочатку різко зменшуються величини відгуків сенсорних елементів, і при концентрації КСІ 10 мМ величини сигналів знижуються приблизно на 5–40 % залежно від ферментів, а при подальших збільшеннях концентрацій КСІ сигнали залишаються стабільними. Можна надати кілька пояснень такого феномену. З одного боку, підвищення іонної сили аналізованого розчину може спричинювати зміни щільності біоселективних мембран мультибіосенсора за рахунок екранування зарядів мембран і, як наслідок, зміни проникності мембран та активності іммобілізованих ферментів. З іншого боку, підвищення іонної сили

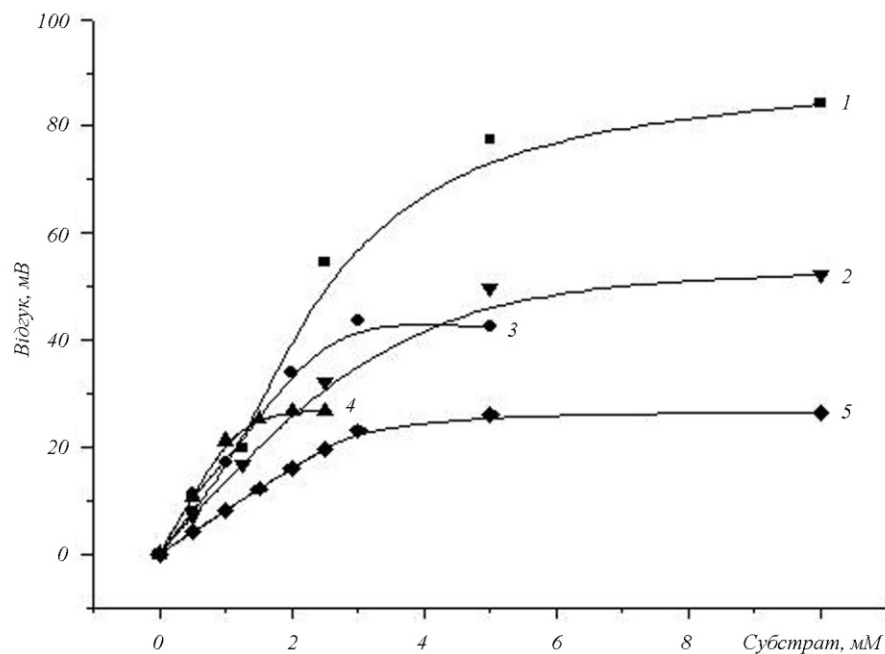


Рис. 3. Залежність величини відгуків мультисенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами (1 – АцХЕ; 2 – уреаза; 3 – БуХЕ; 4 – ГОД; 5 – триферментна система) від концентрації відповідних субстратів

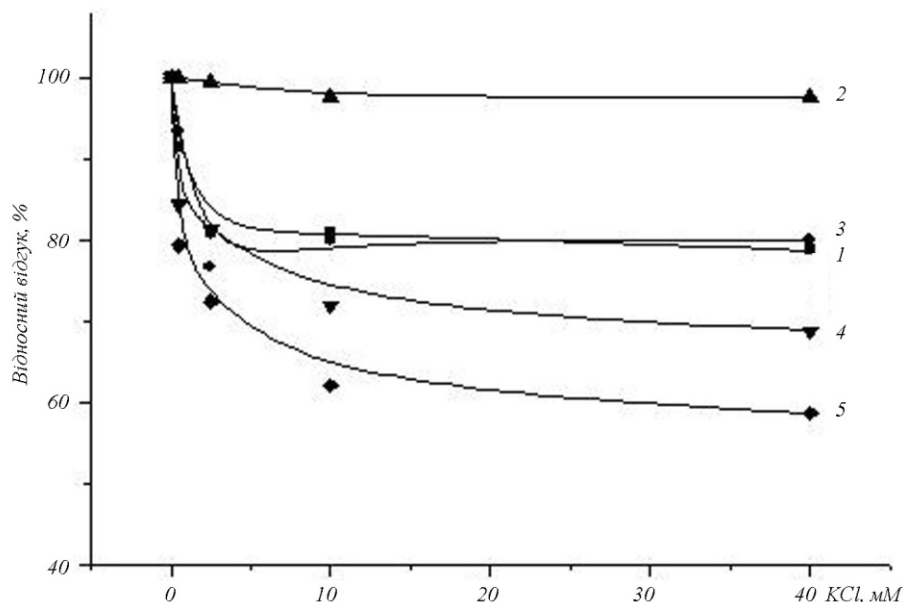


Рис. 4. Залежність величини відгуків мультібіосенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами (1 – АцХЕ; 2 – уреаза; 3 – БуХЕ; 4 – ГОД; 5 – триферментна система) від іонної сили фосфатного буфера

може викликати деяке варіювання швидкості асоціації–дисоціації протонів на іоноселективній мембрані польового транзистора, що також може призводити до модулювання сигналів мультібіосенсора. Тому при вимірюваннях за допомогою матриці ІСПТ дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

Зміна концентрації робочого буфера автоматично змінює іонну силу розчину, що важливо само по

собі, та буферну ємність аналізованого зразка, що є не менш важливим для потенціометричних вимірювань [17].

На рис. 5 показано залежності величин відгуків мультібіосенсора від концентрації фосфатного буфера (різна буферна ємність розчину). Видно, що при зміні концентрації буферного розчину значною мірою коливаються величини відгуків мультібіосенсора. Виявилось, що для сенсора на основі

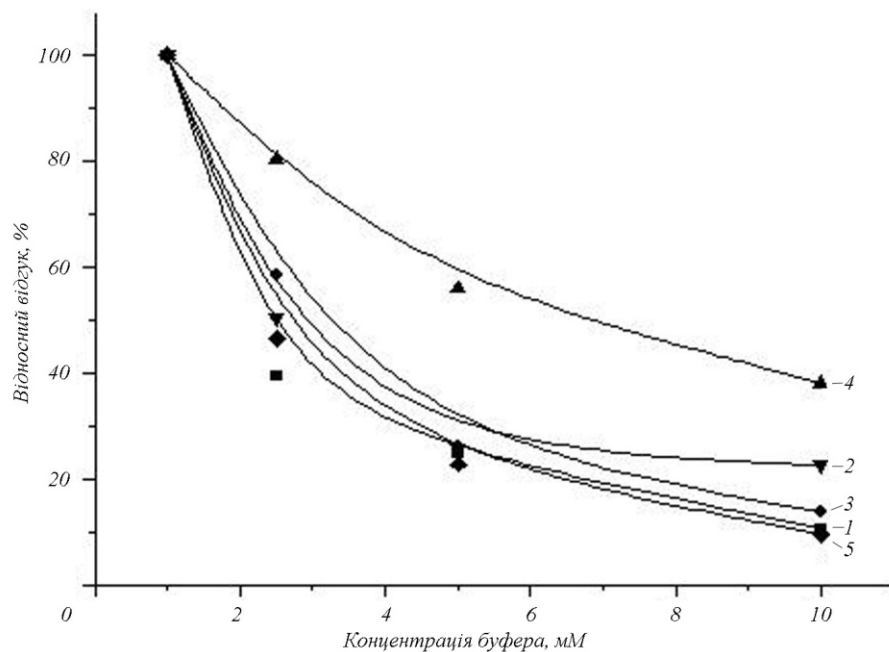


Рис. 5. Залежність величини відгуків мультибіосенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами (1 – АцХЕ; 2 – уреаза; 3 – БуХЕ; 4 – ГОД; 5 – триферментна система) від концентрацій фосфатного буферного розчину

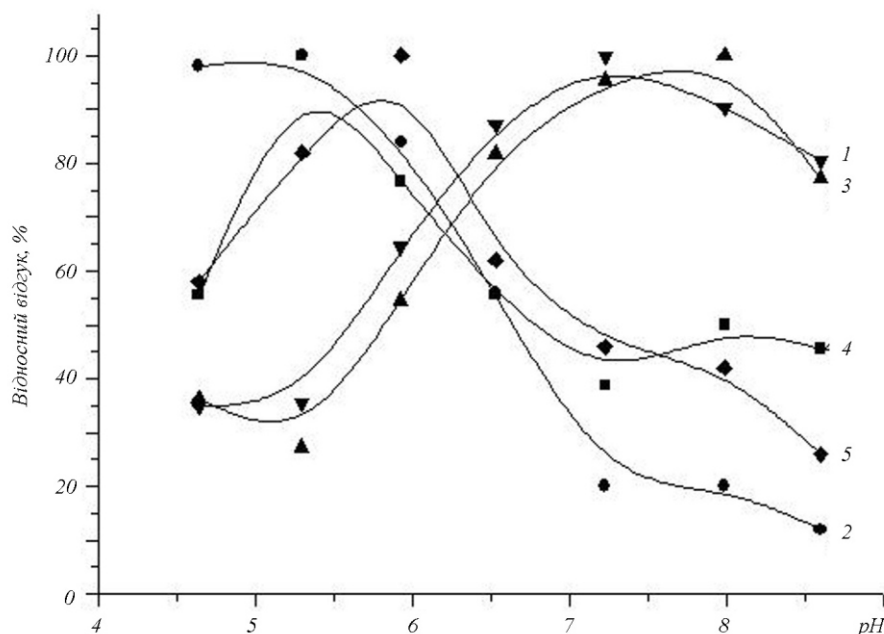


Рис. 6. Залежності величин відгуків мультибіосенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами (1 – АцХЕ; 2 – уреаза; 3 – БуХЕ; 4 – ГОД; 5 – триферментна система) від значення рН 2 мМ універсального буферного розчину

триферментної системи ця залежність найсильніша, а для глюкозооксидазного сенсора, навпаки, – найменша. Але тенденція до зміни чутливості для всього мультибіосенсора була загальною. Чутливість сенсорних елементів щодо наявності субстратів виявилася найбільшою в 1 мМ фосфатному буфері, а найменшою – в 10 мМ.

Як відомо, кожен фермент має свою оптимальну величину рН для роботи. Деякі ферменти після

іммобілізації можуть змінювати свій оптимальний рН, зсуваючи його в лужну або кислу області. У нашому випадку ми маємо декілька іммобілізованих на поверхнях перетворювачів ферментів з різними рН-оптимиумами. Тому наступна задача полягала у виявленні оптимального рН буфера для кожного з цих ферментів і далі, аналізуючи отримані дані, вибрати прийнятний рН для роботи всіх цих ферментів у складі мультибіосенсора. Відомо, що од-

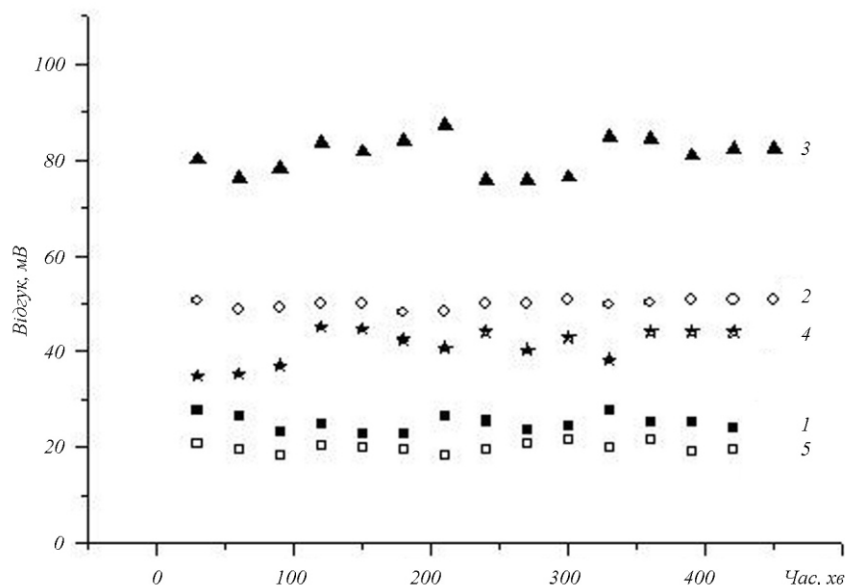


Рис. 7. Відтворюваність сигналів мультибіосенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами (1 – ГОД; 2 – уреаза; 3 – АцХЕ; 4 – БуХЕ; 5 – триферментна система) протягом одного робочого дня. Вимірювання проводили у 2 мМ фосфатному буфері, рН 6

нокомпонентний буфер змінює буферну ємність при зміні його рН [18]. Щоб уникнути додаткових впливів буферних ємностей на величини відгуків, досліджували залежність відгуків мультибіосенсора від рН універсального багатокомпонентного буфера з однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні значень рН [18]. Графіки залежностей величин сигналів на внесення субстратів від рН мали дзвоноподібні форми з різними максимумами (рис. 6). Наприклад, оптимальні значення рН буфера для роботи сенсорних елементів на основі уреазы, ГОД та триферментної системи знаходилося в діапазоні рН 5–6, а для елементів на основі холінестераз оптимум рН був у межах рН 7–8. Оскільки функціонування біоселективних елементів мультибіосенсора відрізнялося за оптимумом рН, то для одночасної роботи всіх елементів мультибіосенсора оптимальне значення рН підбирали, враховуючи такі два показники. Перший – це оптимальне (допустиме) значення рН для одночасної роботи усіх ферментів, а другий – це відносна активність кожного ферменту. Чим вищі відгуки сенсорного елемента, тим більше можливостей до зсуву рН в неоптимальні його значення. Оскільки біосенсорні елементи на основі холінестераз демонструють більші відгуки, ніж елементи на основі уреазы, ГОД та каскаду ферментів (інвертаза, мутаротаза та ГОД), то з'явилася реальна можливість і необхідність зсунути рН робочого буфера у слабкислу область. Таким чином, за оптимальне

значення прийнято величину рН робочого буфера 6,0. У подальших експериментах саме 2 мМ фосфатний буфер з рН 6,0 обрано за робочий при дослідженнях характеристик мультибіосенсора.

Ще однією з важливих характеристик біосенсорів є стабільність роботи та відтворюваність відгуків. Щоб дослідити цей показник, протягом одного робочого дня з інтервалом у 45 хв ми отримували відгуки мультибіосенсора на одну й ту саму суміш субстратів з такими кінцевими концентраціями: 10 мМ АцХ, 5 мМ БуХ, 5 мМ сечовина, 5 мМ цукроза та 2 мМ глюкоза, при цьому матриця ІСПТ з іммобілізованими на них ферментами весь час між вимірюваннями залишалася в робочому буферному розчині за кімнатної температури. Вибрані для досліджень значення концентрацій аналітів знаходилися на відрізках насичення калібрувальних кривих мультибіосенсора. З рис. 7 видно, що мультибіосенсор при квазібезперервній роботі протягом дня відзначався високою відтворюваністю сигналів.

Оскільки матриця з біоселективними елементами мультибіосенсора повинна працювати одночасно в одному й тому ж середовищі та за однакових умов, потрібно було перевірити наявність перехресту за субстратами для окремих біоселективних елементів. У таблиці представлено дані з відгуків матриці на п'ять біоселективних елементів мультибіосенсора на кожний субстрат

Вплив окремих субстратів та їхньої суміші на відгуки біоселективних елементів мультибіосенсора.

Фермент	Вплив субстратів, %					
	10 мМ АцХ	5 мМ БуХ	5 мМ сечовина	2 мМ глюкоза	5 мМ цукроза	Суміш
АцХЕ	100	15	0	0	0	100
БуХЕ	20	100	0	0	0	100
Уреаза	4	3	100	0	0	100
ГОД	4	3	0	100	0	100
Триферментна система	4	3	0	75	100	100
БСА	4	3	0	0	0	8

окремо та на їхню суміш. Як видно з даних таблиці, з усіх використаних ферментів лише уреаз та ГОД і відповідно елементи на їхній основі виявилися високоселективними до своїх субстратів: сечовини і глюкози. Біоселективні елементи на основі ферментів АцХЕ та БуХЕ характеризувалися невеликою перехресною чутливістю до субстратів ацетилхоліну та бутирилхоліну. У той же час вони були нечутливими до субстратів інших ферментів. Також біоселективний елемент на основі трьох ферментів (інвертаза, мутаротаза та ГОД) для визначення цукрози був нечутливим до всіх перехресних субстратів, крім глюкози, і такий вплив виявився значним. Це є повністю зрозумілим, оскільки в складі зазначеного біоселективного елемента є фермент ГОД. При внесенні суміші всіх субстратів усі біосенсорні елементи мультибіосенсора демонструють такі ж величини відгуків, як і при внесенні кожного субстрату окремо. Наведені в таблиці результати перехресного впливу специфічних субстратів на відгуки сенсорних елементів мультибіосенсора є дуже важливими для оцінки прямого визначення субстратів. Ці дані будуть також необхідними при подальшому використанні мультибіосенсора для інгібіторного аналізу токсичних речовин, хоча в такому разі перехресний вплив за субстратами не є таким критичним, як при прямому визначенні субстратів. Крім того, при здійсненні інгібіторного аналізу важливо працювати з такими концентраціями насичення ферментів субстратами, коли відгуки елементів мультибіосенсора є стабільними і добре відтворюваними, тоді залежність від концентрації інгібіторів буде сильно вираженою.

Висновки. Таким чином, вперше створено мультибіосенсор на основі матриці іоноселективних польових транзисторів з іммобілізованими відповідними ферментами для визначення ацетилхоліну, бутирилхоліну, глюкози, цукрози та сечовини. Досліджено оптимальні умови його роботи та проаналізовано основні аналітичні характеристики мультибіосенсора для прямого аналізу субстратів. Розроблений мультибіосенсор за умов деякої його адаптації у перспективі може бути використано для інгібіторного ферментного аналізу токсичних речовин у водних зразках. Підібрані оптимальні умови роботи мультибіосенсора для визначення субстратів також можуть бути враховані в інгібіторному аналізі токсичних речовин.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб».

O. O. Soldatkin, O. A. Nazarenko, O. S. Pavluchenko, O. L. Kukla, V. M. Arkhipova, S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin, A. V. El'skaya

Optimization of enzymatic bioselective elements as components of potentiometric multibiosensor

Summary

The investigation presents the development of highly sensitive and selective multibiosensor based both on a number of immobilized enzymes as bioselective elements and the matrix of ion-selective field effect transistors as transducers of biochemical signal into the electric one. To develop bioselective elements of multi-biosensor, such enzymes as acetylcholinesterase, butyrylcholin esterase, urease, glucose oxidase, and three-enzyme system (invertase, mutarotase, glucose oxidase) were used. Obtained bioselective elements were shown to demonstrate high sensitivity to corresponding substrates in direct enzymatic analysis, which lasted 10 min. Dynamic range of substrate determination (0.1 mM–1.5–10 mM) was shown to depend on enzymatic system and to differ

specifically in upper threshold. Current work presents the investigation on the dependence of multibiosensor response on pH, ionic strength, and buffer capacity of the solution; optimal conditions for simultaneous operation of all bioselective elements of the multibiosensor were selected; the data on cross-influence of substrate of all enzymes used were obtained. The developed multi-analyzer was shown to demonstrate sufficient signal reproducibility.

Keywords: multibiosensor, immobilized enzymes, ion-selective field transistors, glucose oxidase, direct substrate analysis, inhibitor analysis.

A. A. Солдаткин, Е. А. Назаренко, А. С. Павлюченко,
А. Л. Кукла, В. Н. Архипова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин,
А. В. Ельская

Оптимизация работы ферментных биоселективных элементов в составе потенциометрического мультибиосенсора

Резюме

Разработаны высокочувствительный и селективный мультибиосенсор на основе ряда иммобилизованных ферментов как биоселективных элементов и матрицы ионоселективных полевых транзисторов в качестве преобразователей биохимического сигнала в электрический. Для создания биоселективных элементов мультибиосенсора использовали ферменты ацетилхолинэстеразу, бутирилхолинэстеразу, уреазу, глюкозооксидазу и трехферментную систему (инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза). Полученные биоселективные элементы в прямом ферментном анализе демонстрировали высокую чувствительность к выявленным субстратам. Время проведения анализа составляло 10 мин. Динамический диапазон определения субстратов зависел от ферментной системы, особенно отличался верхней границей определения и находился в пределах от 0,1 мМ до 1,5–10 мМ. Проверена зависимость отклика мультибиосенсора от pH, ионной силы и буферной емкости раствора, подобраны оптимальные условия для одновременной работы всех биоселективных элементов мультибиосенсора, представлены данные по перекрестному влиянию субстратов всех использованных ферментов. Разработанный мультианализатор также характеризуется хорошей воспроизводимостью сигнала

Ключевые слова: мультибиосенсор, иммобилизованные ферменты, ион селективные полевые транзисторы, глюкозооксидаза, прямой анализ субстратов, ингибиторный анализ.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yatsenko V. Determining the characteristics of water pollutants by neural sensors and pattern recognition methods // J. Chromatogr. A.—1996.—**722**.—P. 233–243.
2. Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontiden I., Soukharev V., Dorneanu S. A., Ryabov A. D., Csoregi E. Biosensors for life quality design, development and applications // Sensors and Actuators.—2004.—**102**.—P. 179–194.
3. Горобец П. Ю., Ильченко И. Н., Ляпунов С. М., Шугаева Е. Н. Распространенность экологически зависимых нарушений нервно-психического развития у детей в возрасте 4–7 лет при хроническом воздействии тяжелых металлов в малых дозах // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья.—2005.—№ 1.—P. 14—20.

4. Schuman S. H., Simpson W. M. A clinical historical overview of pesticide health issues // Occup. Med.—1997.—**12**.—P. 203–207.
5. Johnson B. L. A review of health-based comparative risk assessments in the United States // Rev. Environ. Health.—2000.—**15**.—P. 273–287.
6. Arkhipova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Jaffresic H., Martlet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances // Talanta.—2001.—**55**.—P. 919–927.
7. Verscheuren K. Handbook of environmental data on organic chemicals.—New York: Van Norstrand Reinhold, 1983.—673 p.
8. Dzantiev B. B., Yazynina E. V., Zherdev A. V., Plekhanova Yu. V., Reshetilov A. N., Chang S. C., McNeil C. J. Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bionzyme immunoassay // Sensors and Actuators.—2004.—**98**.—P. 254–261.
9. Sherma J., Zweig G. Pesticides // Anal. Chem.—1983.—**55**.—P. 57.
10. Tran-Minh C., Pandey P. C., Kumaran S. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase // Biosensors & Bioelectronics.—1990.—**5**.—P. 461–471.
11. Солдаткин О. О., Сосовська О. Ф., Бенілова І. В., Гончар М. В., Корпан Я. І. Ензимний кондуктометричний сенсор для визначення формальдегіду у модельних розчинах // Біополімери і клітина.—2005.—**21**, № 5.—С. 425–432.
12. Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination // Sensors and Actuators.—1995.—**24–25**.—P. 145–148.
13. Kukla A. L., Kanjuk N. I., Starodub N. F., Shirshov Yu. M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions // Sensors and Actuators.—1999.—**57**.—P. 213–218.
14. Moreno L., Merlos A., Abramova N., Jimenez C., Bratov A. Multi-sensor array used as an «electronic tongue» for mineral water analysis // Sensors and Actuators B.—2006.—**116**.—P. 130–134.
15. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии.—М.: Химия, 1967.—Т. 3.—230 с.
16. Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A., Netchiporouk L. I., Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. Glucose-sensitive field-effect transistor with additional Nafion membrane // Anal. Chim. Acta.—1993.—**283**.—P. 695–701.
17. Dzyadevich S. V., Arkhipova V. A., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A. Glucose conductometric biosensor with Potassium hexacyanoferrate(III) as an oxidizing agent // Anal. Chim. Acta.—1998.—**374**.—P. 11–18.
18. Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Ельская А. В. Ферментные биосенсоры для определения пенициллина на основе кондуктометрических планарных электродов и pH-чувствительных полевых транзисторов // Укр. биохим. журн.—1996.—**68**.—С. 26–31.