

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ В ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЁНКАХ

¹Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

²ГО «НПЦ НАН Беларуси по материаловедению», Минск, Беларусь

В данной работе разработана конструкция макета ферментного биосенсора и определены условия синтеза полимерных пленок на основе бычьего сывороточного альбумина и поливинилового спирта для иммобилизации фермента глюкозооксидазы, применяемого в амперометрических датчиках для определения глюкозы. Проведены исследования полученных биосенсорных структур методом импедансной спектроскопии. Установлены оптимальные режимы для селективного определения концентрации пероксида водорода в биологических жидкостях. Разработанные макеты биосенсоров могут найти применение в медицинской диагностике.

Одной из актуальных задач в современной нанобиотехнологии является разработка новых эффективных средств индикации и диагностики, применяемых в медицине, а также в пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Для этих целей широко используются электрохимические сенсоры [2] амперометрического типа, принцип работы которых основан на измерении тока, возникающего в результате электрохимического окисления или восстановления электроактивных веществ. Наиболее распространенными из них являются ферментные амперометрические сенсоры. Например, сенсоры для определения глюкозы в крови широко применяются в медицинской диагностике.

Использование ферментативных методов анализа для количественного определения химических веществ в растворе обусловлено высокой селективностью и точностью идентификации компонент, низкой температурой реакций (не превышающей 37°C). Ферменты способны катализировать превращения веществ с большой скоростью и высокой избирательностью. Однако ферментативные методы анализа имеют некоторые недостатки, обусловленные рядом особенностей ферментов, связанных с потерей их функциональной активности и стабильности под воздействием различных факторов, а также высокой стоимостью из-за невозможности многократного использования растворимых ферментов и сложности их отделения от реагентов и конечных продуктов реакции. Всё это является причиной их однократного применения и, как следствие, высокой стоимости. Для устранения этих недостатков при создании многоразовых диагностических систем применяется иммобилизация ферментов на носителях различной структуры [1].

В данной работе проводилось исследование полимерных пленок на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) и поливинилового спирта (ПВС) для иммобилизации ферментов, применяемых в биоэлектрохимических датчиках определения глюкозы.

Исходя из особенностей реакции окисления глюкозы была разработана конструкция макета ферментного биосенсора (тест-системы). Продуктом окисления глюкозы с участием фермента глюкозооксидазы (ГОД) является пероксид водорода. Окислительно-восстановительная реакция его разложения происходит на платиновом электроде при потенциале от 0,0 до 0,7 В. В результате данной реакции образуются электроны, ток от которых фиксируется при помощи наноамперметра.

В биосенсорах на основе печатных электродов оптимально использование системы электродов со стандартным хлорсеребряным электродом в качестве электрода сравнения. В наших исследованиях наилучшими получились трансдьюсеры, хлорсеребряный электрод в которых получен потенциостатическим трехэлектродным методом в водном растворе 0,1 М HCl при положительном потенциале $U=0,25$ В на электроде сравнения в течение 10 минут при $T=18^{\circ}\text{C}$. Конструкция макета (**рисунок 1**) представляет собой трансдьюсер с нанесёнными на диэлектрическую (ситалловую) подложку толщиной 0,7 мм электродами, изготовленными послойно методами трафаретной печати, и функциональными ферментными слоями, наносимыми вручную через трафарет. Разрабатываемая тест-система представляет собой индикаторный (рабочий) платиновый электрод площадью 0,7 мм² (2) и хлорсеребряный

Секция 4. Прикладные проблемы физики конденсированного состояния

(Ag/AgCl) электрод сравнения (3). Вспомогательным являлся серебряный электрод (1), площадь поверхности которого была почти в 10 раз больше ($6,2 \text{ мм}^2$) площади рабочего электрода. Полученная таким образом химическая трехэлектродная ячейка позволяет с достаточно высокой точностью проводить качественный и количественный анализ компонент в биологических жидкостях с точностью до 10^{-6} моль/л [1].

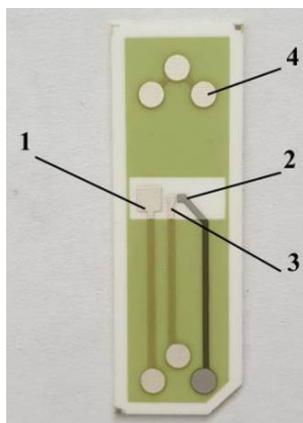


Рисунок 1 – Внешний вид поверхности электродов.

1 – Ag вспомогательный электрод; 2 – Pt рабочий (индикаторный) электрод; 3 – Ag/AgCl электрод сравнения; 4 – группа контактов для идентификации типа диагностической тест-системы.

При формировании биосенсорной системы в качестве биокатализатора использовался ферментный препарат ГОД производства Института микробиологии НАН Беларуси. Так же использовалась смесь ферментов глюкоза-оксидаза с различным количеством каталазы и различной активностью препаратов. В качестве жидкости для исследования использовались системный раствор (на основе фосфатного буфера с хлоридом калия и консервантами) для анализаторов глюкоза/лактата; калибровочные растворы глюкозы – 4, 12, 30 ммоль/л (производства «Эко-сервис», Россия); водный раствор пероксида водорода 3 мг/мл.

Перед нанесением полимерных пленок все электроды обрабатывались берлинской лазурью, которая использовалась в качестве электрокатализатора реакций окисления и восстановления пероксида водорода. Для улучшения адгезии в некоторых образцах использовался аминопропилтриэтоксисилан. Для сшивки свободных групп использовались смесь БСА с глутаровым альдегидом (ГА). Образцы пленок были насыщены ферментом ГОД. В качестве медиатора использовались ферроцианид калия, жёлтая и красная кровяная соль, гидрохинон, ферроцен, берлинская лазурь (БЛ). Пленки наносились ручным способом. Толщина пленок варьировалась от 0,1 до 1 мм. Измерение толщины проводились интерференционным методом и на профилометре. Так как при температурах $T \geq 40 \text{ }^\circ\text{C}$ активность фермента ГОД существенно падает, процесс полимеризации пленок проводился при температурах $25 \text{ }^\circ\text{C}$ и $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Для исследования функциональных свойства полученных биосенсорных структур проводились хроно-амперометрические и циклические вольт-амперометрические измерения (импедансная спектроскопия). В процессе проведения электрофизических измерений температура образцов и подаваемых растворов составляла $35 \dots 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Система измерения позволяла селективно распознавать в жидкой биологической смеси пероксид водорода, концентрация которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в растворе. Для определения концентрации глюкозы в произвольном растворе использовалось опорное значение силы тока, возникающего при ферментном окислении глюкозы в стандартном 12 ммоль/л растворе.

Оптимальные режимы для селективного определения концентрации пероксида водорода в биологических жидкостях реализуются при потенциалах электрода сравнения $U = 0,58 \text{ В}$ и вспомогательного электрода $U_{\text{ref}} = 0,58 \text{ В}$ относительно рабочего электрода. Увеличение в несколько раз измеряемого тока при введении в раствор пероксида водорода, а также его снижение после промывки системным раствором свидетельствует об активных процессах

разложения пероксида водорода с интенсивным выделением кислорода в установленных режимах (рисунок 2).

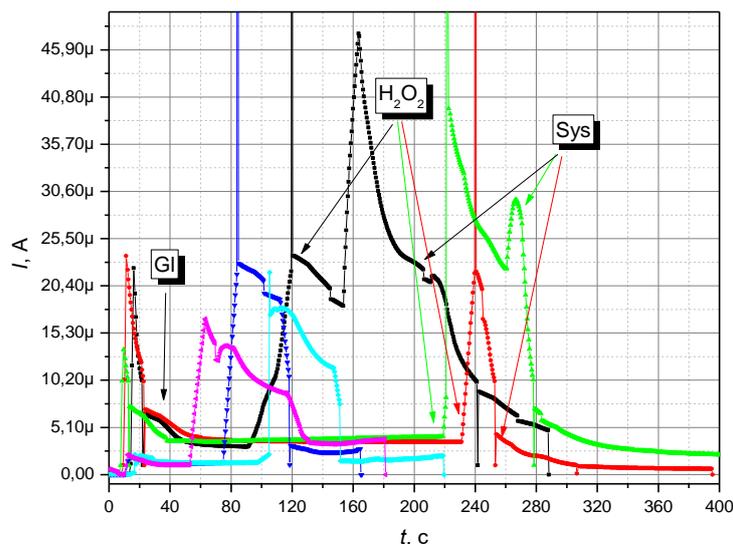


Рисунок 2 – Хроно-амперометрическая зависимость трансдьюсера (электрохимической ячейки) от различных жидкостей в методе проточно-инжекционного анализа:

Gl – глюкоза, H_2O_2 – пероксид водорода, Sys – системный промывочный раствор.

На рисунке 3 представлен примеры электрических характеристик полученных образцов полимерных пленок с ферментом. Так, для полимерных пленок на основе БСА и ПВС с сшивкой ГА время размокания после смачивания системным раствором для анализаторов глюкоза/лактата составляет менее 5 минут. При попадании глюкозы на поверхность пленки изменение величины рабочего тока составляет до 300 нА при времени выхода на максимум менее 30 секунд. Данные результаты говорят о высокой скорости прохождения химической реакции ферментного окисления глюкозы.

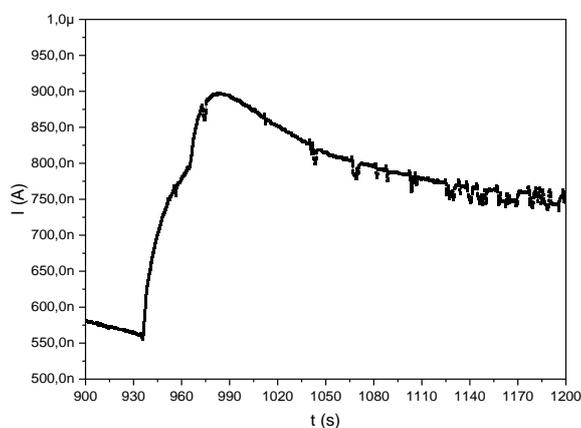


Рисунок 3 – Хроно-амперометрическая зависимость в процессе разложения глюкозы и перекиси водорода в полимерной пленке на основе БСА и на основе ПВС с сшивкой ГА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Биотехнологии – 2» на 2021-2025 годы (Подпрограмма «Микробные биотехнологии-2» НИР 2 задание 3.5, номер гос. регистрации 20211118).

Список литературы

1. Андрюков Б. Г., Ляпун И. Н., Матосова Е. В., Сомова Л. М. Биосенсорные технологии в медицине: от детекции биохимических маркеров до исследования молекулярных мишеней (обзор). Биосенсорные технологии в медицине, 2020, №6 (12), С. 70–85.
2. Mikhelson K. N., Peshkova M. A. Advances and trends in ionophore-based chemical sensors. Russian Chemical Reviews, 2015, 84(6), С. 555.