

ВЫБОР ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА БИОСЕНСОРНОГО УСТРОЙСТВА – БИОЛОГИЧЕСКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Сартова М.Ж., магистр, Аринова Э.Ж., магистр

Государственный университет имени Шакарима города Семей, Казахстан

Аннотация. Основой для создания систем ферментативного анализа послужили последние достижения в области энзимологии и инженерной энзимологии. Уникальные качества ферментов - специфичность действия и высокая каталитическая активность - способствуют простоте и высокой чувствительности этого аналитического метода.

Цель работы – оценка аналитических возможностей определения микотоксинов (афлатоксина В1) с помощью амперометрических биосенсоров на основе стеклянных электродов и иммобилизованной холинэстеразы.

В качестве биочувствительного элемента устройства выбраны ферменты – Холинэстеразы.

Предпосылкой для проведения исследований послужили единичные литературные данные о влиянии АФВ1 на каталитическую активность холинэстеразы [1].

В указанной работе впервые было отмечено ингибирующее действие АФВ1 на этот фермент. Авторы использовали это свойство микотоксина для разработки соответствующего биосенсора. Отметим, что рассматриваемые холинэстеразные биосенсоры разработаны на основе другого первичного преобразователя (транздьюсера) и другого способа иммобилизации фермента.

Холинэстеразы - семейство ферментов, относящееся к классу гидролаз. При оптимальных условиях они катализируют гидролиз эфиров холина с большей скоростью, чем других эфиров. Холинэстеразы можно разделить на два типа: первый из них преимущественно катализирует гидролиз ацетилхолина (АХ), а второй – таких эфиров холина, как бутирилхолин (БуХ), пропионилхолин (ПХ) и др. Систематическое название первого типа холинэстераз по номенклатуре ферментов – ацетилхолин-ацетилгидролаза. Однако чаще используют его название – ацетилхолинэстераза (синонимы: холинэстераза I и ацетилхолингидролаза). Второй тип ферментов имеет систематическое название ацилхолин - ацилгидролаза и тривиальное название холинэстераза, синонимами которого являются: псевдохолинэстераза, бутирилхолинэстераза (БуХЭ), холинэстераза II, пропионилхолинэстераза (ПХЭ).

В данной работе использовался электрохимический способ определения веществ - микотоксинов. На стеклянные электроды, покрытые оловом, на поверхность которого наносились ферменты – иммобилизация ферментов.

На кафедре Стандартизации и биотехнологии, в лаборатории биопрепаратов проводили экспериментальные исследования по иммобилизации ферментов и определению их активности.

В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин хлорид (БТХХ), раствор которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более 3 ч. Применяли бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади (активность 30 Е/мг), изготовленную НПО «Биомед» (Россия, г. Пермь). Применяли 1%-ный раствор глутарового альдегида и бычий сывроточный альбумин (БСА).

Для получения рабочих растворов из стандартных образцов микотоксинов проводили отгонку бензола, ацетонитрила и уксусной кислоты при комнатной температуре. Полученный препарат АФВ1 взвешивали и использовали для приготовления рабочих растворов путем их растворения в 1 мл ацетонитрила, а затем в бидистиллированной воде.

Иммобилизацию ферментов проводили ковалентно-химическим методом, т.е. кросс-сшивкой биополимеров между собой. Для иммобилизации фермента в электроде готовили раствор АцХЭ из сыворотки крови (4,2 Е/мг) в фосфатном буферном растворе с рН 6,86, далее наносили раствор на поверхность электрода из расчета 0,8 Е/см² рабочей поверхности. После полного высыхания раствора при комнатной температуре электрод опускали на 1 мин в 5 % раствор глутарового альдегида, после чего сразу погружали в рабочий буферный раствор, затем отмывали дистиллированной водой, с повторностью 3 раза до исчезновения запаха глутарового альдегида. На рисунке 1 показана схема иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы [2, 3].

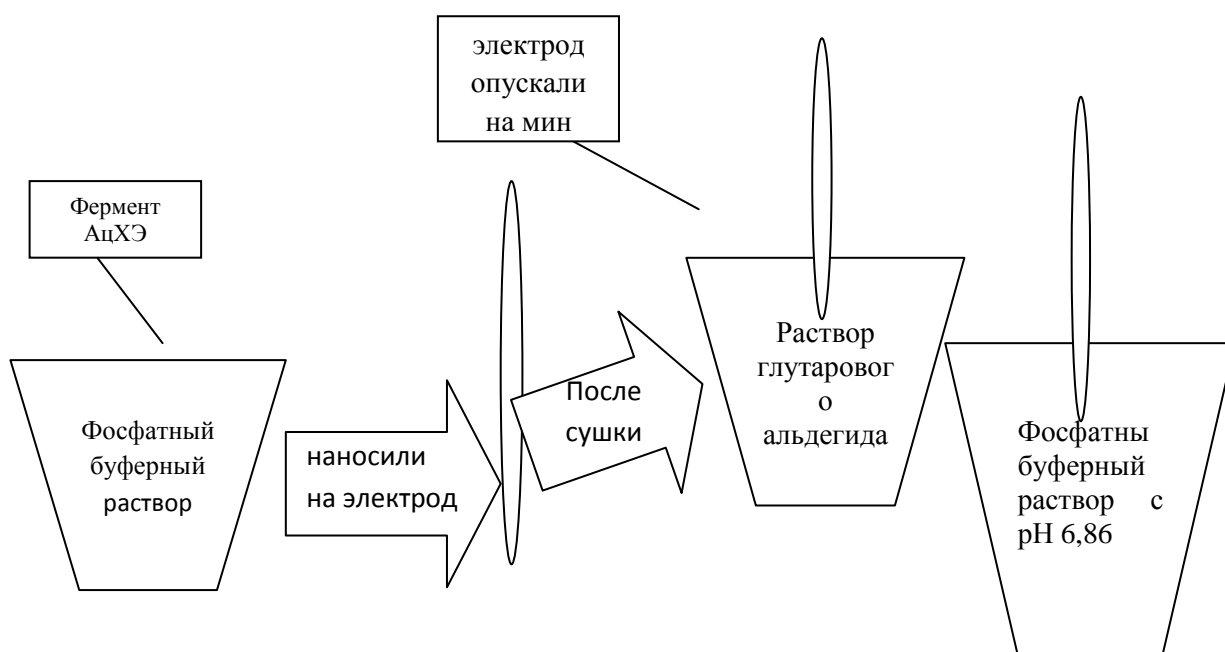


Рисунок 1. Схема иммобилизации фермента. Носитель - $2 \times 10^{-3} \text{M}$ фосфатный буферный раствор

Контрольный опыт. Иммобилизация АцХЭ на нейлоновых и нитратцеллюлозных мембранах. Нейлоновые и нитрацеллюлозные мембраны смачивали бидистиллированной водой и выкладывали на стеклянную пластину. После удаления избытка жидкости на влажную поверхность с помощью

микродозатора наносили 10-1000 мкл (в зависимости от площади мембраны) раствора фермента. Чтобы раствор фермента равномерно смочил мембрану. После этого мембрану высушивали при комнатной температуре в потоке воздуха, погружали на 3 мин в 5% раствор глутарового альдегида и далее многократно промывали сначала дистиллированной водой, потом 0,002 М фосфатным буферным раствором с рН 7,8, до исчезновения запаха глутарового альдегида.

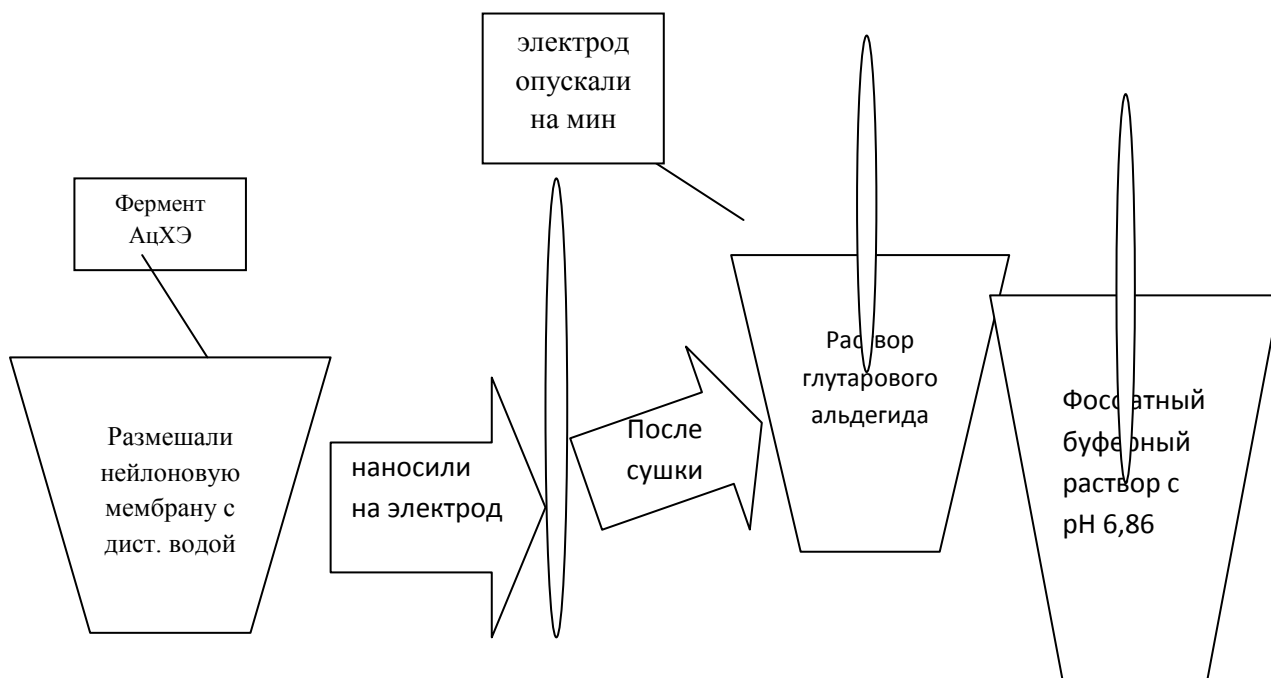


Рисунок 2. Схема иммобилизации фермента. Носитель - Нейлоновые и нитрацеллюлозные мембраны

На рис. 3 представлены зависимость отклика холинэстеразного биосенсора от условий нанесения нафторного покрытия и фосфатным буферным раствором.

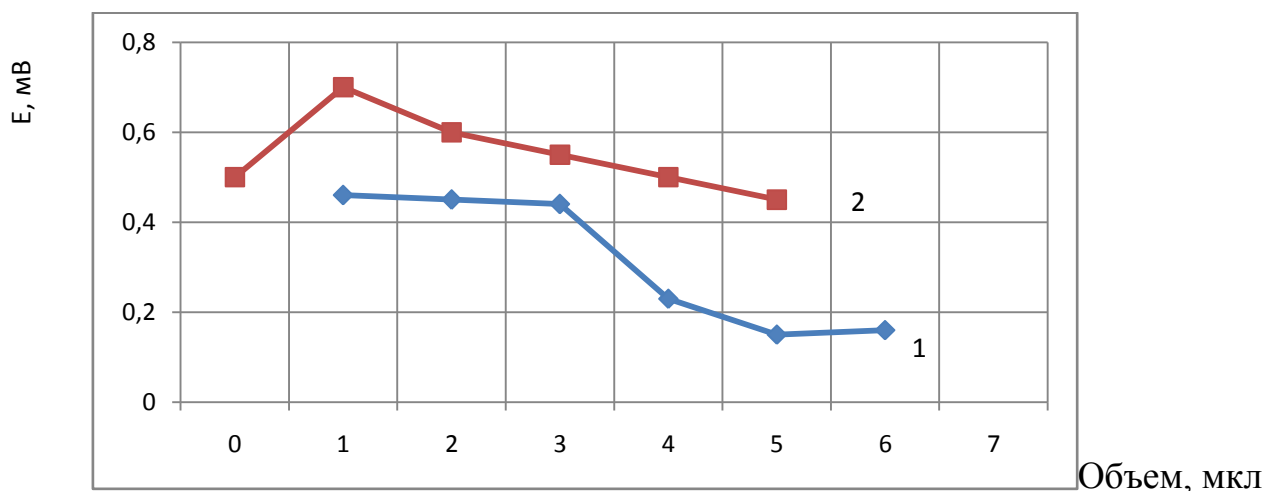


Рисунок 3. Зависимость отклика холинэстеразного биосенсора от условий нанесения нафторного покрытия (1) и фосфатным буферным раствором (2)

Как видно, при увеличении толщины покровного слоя при увеличении объема раствора (рис. 3) на рабочей поверхности электрода происходит уменьшение отклика биосенсора на субстрат.

1. Определение активности иммобилизованного фермента

Для определения активности иммобилизованного фермента использовали лабораторный рН-метр (Марк-901), в качестве преобразователей применяли стеклянные электроды. Электроды, иммобилизованные ферментом ацетилхолинэстеразы в количествах 0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 и 0,30 мг помещали в рабочие ячейки, содержащие 5 мл рабочего буферного раствора. После кондиционирования в течение 5-7 мин в ячейку вводили раствор ацетилхолин хлорида (АХХ), до его объемной концентрации $(1-2) \times 10^{-3}$ М. После этого регистрировали величину электродной пары до постоянства ее значения во времени (отклика биосенсора) с использованием программ Осцилограф полярограф на компьютере [4,5].

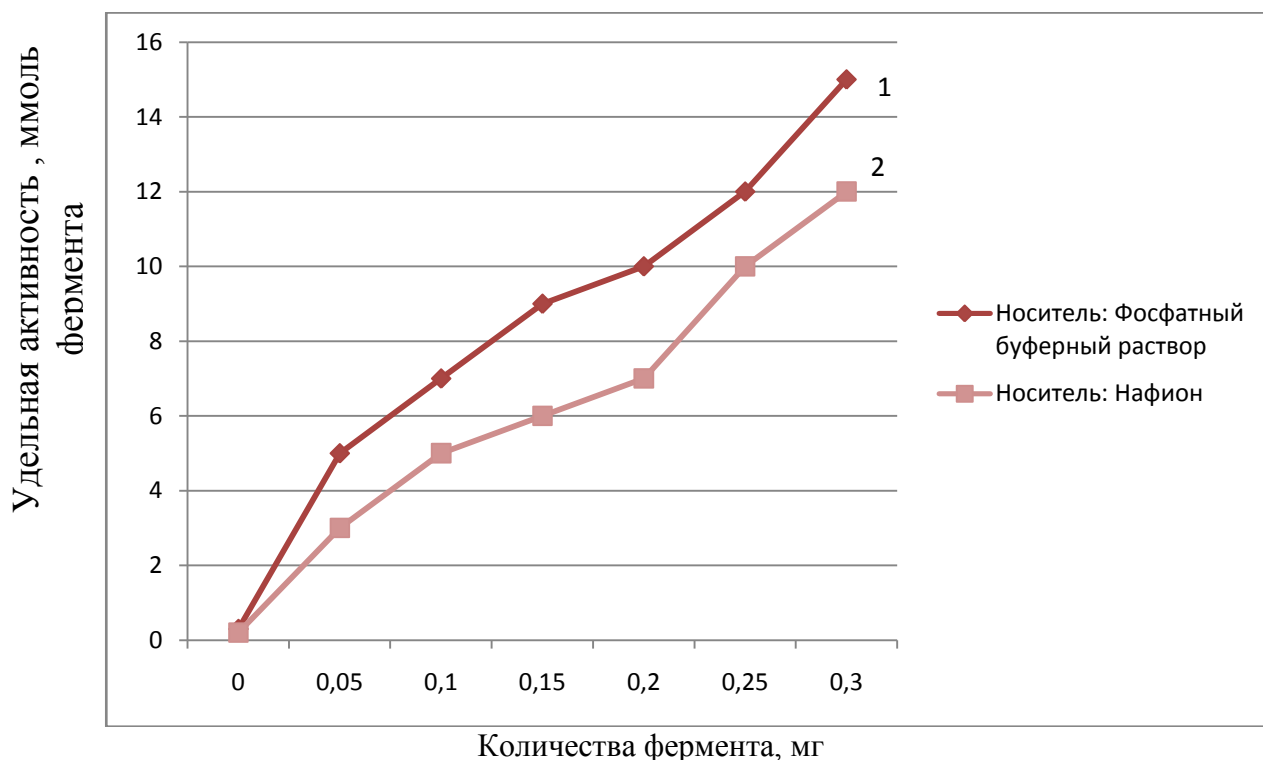


Рисунок 4. Сигнал потенциометрического холинэстеразного биосенсора: АХЭ («Sigma») иммобилизована на поверхности стеклянного электрода с фосфатным буферным раствором (1) и нафийонным покрытием (2); Оптимальная концентрация ацетилхолина АХХ 2×10^{-3} М.

Таблица 1

З ависимость отклика холинэстеразного биосенсора и количества фермента и концентрации носителей

Количество фермента, мг	Удельная активность фермента, ммоль	
	Носитель: Фосфатный буферный раствор	Носитель Нафион
0,01	0,3	0,2
0,05	5	3
0,1	7	5
0,15	9	6
0,2	10	7
0,25	12	10
0,3	15	12

Из рисунков видно, что количество фермента 0,2 мг соответствует оптимуму разности удельной активности ацетилхолинэстеразы без ингибирования. Из графика, рисунка 4 и по таблице 1 видно, что иммобилизация (носитель - фосфатно буферный раствор) расширяет диапазон определяемых концентраций (субстрата) по сравнению с толстослойными (нафионными) мембранами.

2. Подготовка модельных растворов на основе молока

Растворы афлатоксинов, не требующих окисления, в этиловом спирте или ацетонитриле разбавляли до нужной концентрации тем же растворителем. Затем 10-50 мкл этого раствора добавляли в 5-10 мл молока и устанавливали рН до значения рН рабочего буферного раствора с помощью 10% раствора гидроксида натрия. Растворы афлатоксинов готовили в пяти образцах с различной концентрацией ингибиторов $0,76 \times 10^{-3}$ ммоль; $3,8 \times 10^{-3}$ ммоль; $8,5 \times 10^{-3}$ ммоль; 15×10^{-3} ммоль; 30×10^{-3} ммоль. Полученные растворы использовали для инкубирования биосенсора.

Таблица 2

Концентрация растворов афлатоксина

Афлатоксин хлорофос	рН
$0,76 \times 10^{-3}$ ммоль	5,78
$3,8 \times 10^{-3}$ ммоль	6,02
$8,5 \times 10^{-3}$ ммоль	6,30
15×10^{-3} ммоль	7,90
30×10^{-3} ммоль	8,10

При использовании афлатоксинов, требующих окисления, готовили раствор афлатоксина в молоке по методике, описанной выше, но с добавлением в молоко кристаллического NaCl до концентрации 0.1 М. в полученный раствор опускали стеклянный электрод и проводили электролиз в течение 5 мин. После

этого устанавливали значение pH рабочего буфера с помощью 10% раствора гидроксида натрия. Приготовленный таким образом раствор также использовали для инкубирования биосенсора.

Статистическую обработку результатов измерений проводили стандартными методами с использованием программ Осцилограф полярограф на компьютере [6].

3. Измерение содержания афлатоксинов амперометрическим биосенсором

После измерения отклика на субстрат и промывки буферным раствором биосенсор помещали на 10 мин в раствор ингибитора с различной концентрацией $0,76 \times 10^{-3}$ ммоль; $3,8 \times 10^{-3}$ ммоль; $8,5 \times 10^{-3}$ ммоль; 15×10^{-3} ммоль; 30×10^{-3} ммоль, после чего ополаскивали буферным раствором и переносили в ячейку, содержащую 5 мл рабочего буферного раствора. Через 2-3 мин, после установления стационарного значения сигнала (тока), вводили субстрат (афлатоксин В1) и регистрировали сигнал как описано выше. После реактивации биосенсоров промывали в рабочем буферном растворе для удаления избытка реактиватора.

При количественной оценке влияния на сигнал обратимых эффекторов ХЭ- в ячейку последовательно добавляли субстрат. Градуировочные зависимости определения ингибиторов и эффекторов строили в координатах $I, \% - \lg C_1$, где $I, \%$ - относительное снижение сигнала биосенсора после его контакта с раствором ингибитора (степень ингибирования ХЭ), а C_1 - концентрация ингибитора.

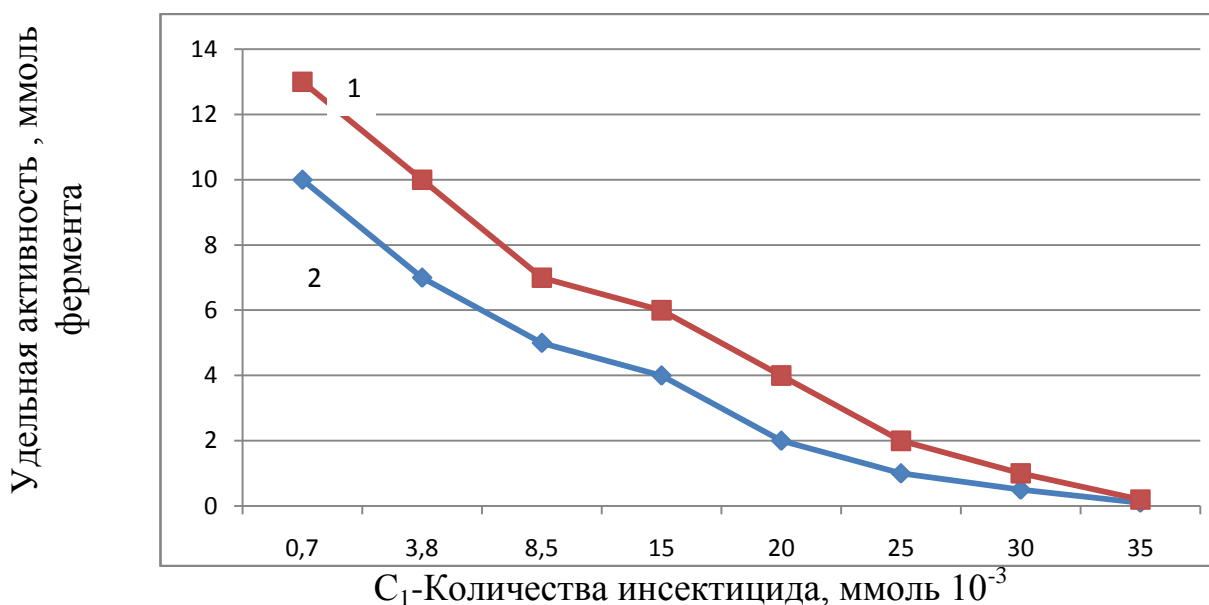


Рисунок 5. Сигнал потенциометрического холинэстеразного биосенсора: АХЭ («Sigma») иммобилизована на поверхности стеклянного электрода с фосфатным буферным раствором (1) и нафийным покрытием (2).

Таблица 3

Влияние количества карбафоса на иммобилизованный фермент
ацетилхолинэстеразу

Количество афлатоксина В1, ммоль 10^{-3}	Удельная активность фермента, ммоль	
	Носитель: Фосфатный бу- ферный раствор	Носитель: Нафион
$0,76 \times 10^{-3}$ ммоль	10	13
$3,8 \times 10^{-3}$ ммоль	7	10
$8,5 \times 10^{-3}$ ммоль	5	7
15×10^{-3} ммоль	4	6
30×10^{-3} ммоль	0,5	1

Из полученных данных видно, что количества хлорофоса, равное $0,76 \times 10^{-3}$ ммоль, снижает удельную активность иммобилизованного ферментов ацетилхолинэстеразы на 21,4% соответственно. Дальнейшее увеличение количества инсектицидов с $0,76 \times 10^{-3}$ до 45×10^{-3} ммоль полностью угнетает действие фермента [7].

4. Подготовка модельных растворов на основе молока

Растворы афлатоксина не требующих окисления, в этиловом спирте или ацетонитриле разбавляли до нужной концентрации тем же растворителем. Затем 10-50 мкл этого раствора добавляли в 5-10 мл молока и устанавливали рН до значения рН рабочего буферного раствора с помощью 10% раствора гидроксида натрия. Растворы афлатоксина В1 готовили в пяти образцах с различной концентрацией ингибиторов $0,76 \times 10^{-3}$ ммоль; $3,8 \times 10^{-3}$ ммоль; $8,5 \times 10^{-3}$ ммоль; 15×10^{-3} ммоль; 30×10^{-3} ммоль. Полученные растворы использовали для инкубирования биосенсора.

Таблица 4

Растворы ингибиторов с различной концентрацией

Афлатоксин хлорофос	рН
$0,76 \times 10^{-3}$ ммоль	5,78
$3,8 \times 10^{-3}$ ммоль	6,02
$5,5 \times 10^{-3}$ ммоль	6,30
$8,9 \times 10^{-3}$ ммоль	7,90
10×10^{-3} ммоль	8,10

При использовании афлатоксина, требующих окисления, готовили раствор афлатоксина в молоке по методике, описанной выше, но с добавлением в молоко кристаллического NaCl до концентрации 0.1 М. в полученный раствор опускали стеклянный электрод и проводили электролиз в течение 5 мин. После этого устанавливали значение рН рабочего буфера с помощью 10% раствора гидроксида натрия. Приготовленный таким образом раствор также использовали для инкубирования биосенсора.

Статистическую обработку результатов измерений проводили стандартными методами с использованием программ Осцилограф полярограф на компьютере.

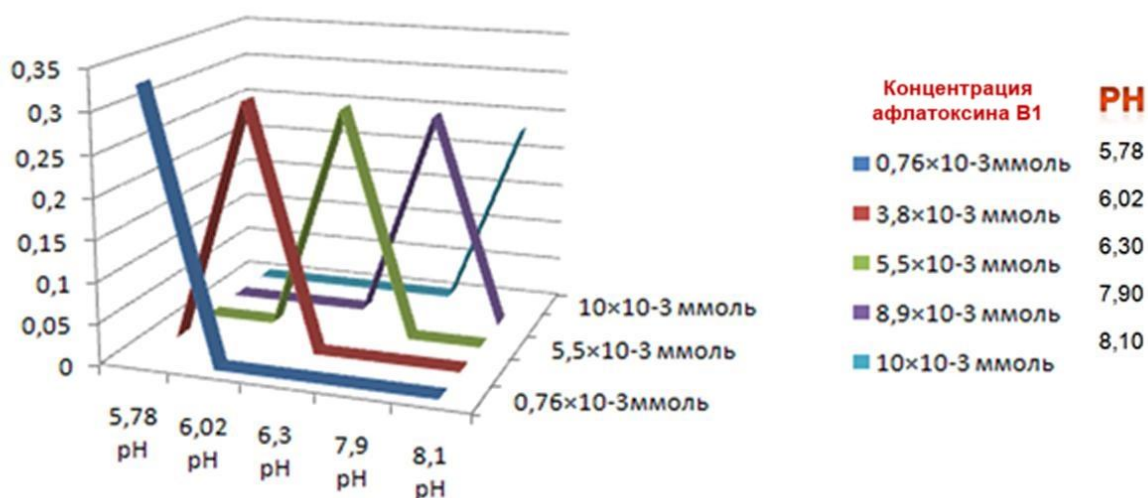


Рисунок 6. 0,002 М фосфатный буферный раствор, рН 7,8 зависимость звука от концентрации ацетохолина. Интенсивность звука 7-9 мин.

Из графика видно, что чем выше значение рН, тем больше концентрации фосфорорганических пестицидов в молоке.

Выводы:

Изучение действия АфВ1 на иммобилизованную АцХЭ, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора, показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение величины тока окисления продукта ферментативного гидролиза БТХХ (субстрат бутирилтиохолин хлорид приготовленной из сыворотки лошади) по сравнению с контрольными опытами, проведенными в отсутствие в растворе афлатоксина В1. Таким образом, можно сделать вывод, что афлатоксин оказывает ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ в составе биосенсора.

Литература

1. Pohanka, M. Aflatoxin assay using an amperometric sensor strip and acetylcholinesterase as recognition element / M. Pohanka, K. Kuca, D. Jun // *Sens. Lett.* – 2008. – V. 6, No 3. – P. 450–453.
2. Ильичева, Н.Ю. Холинэстеразные биосенсоры для определения гербицида пропанила / Н.Ю. Ильичева, Р.М. Бейлинсон, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников, О.Н. Ванягина // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2002. – Т. 43, № 6. – С. 409–412.
3. Arduini, F. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) / F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, G. Palleschi // *Microchim. Acta.* – 2010. – V. 170, No 3–4. – P. 193–214.

4. Медянцева, Э.П. Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами / Э.П. Медянцева, Май Тхи Тхань Х., Р.М. Варламова // Ученые записки казанского университета. - 2012. - Том 154, кн.1.
5. Хуен, М.Т.Т. Амперометрические биосенсоры для определения некоторых микотоксинов: автореф. дис...канд. хим. наук: 02.00.02 / М.Т.Т. Хуен. – Казань, 2013 – 18 с.
6. Кудряшов, А.П. Биосенсорные устройства / А.П. Кудряшов // Курс лекций. - Минск, 2003. – 113 с.