

УДК 577.15.086.83

О. Г. Сафронова, В. И. Хиченко

(Новосибирск)

**БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ
ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В РАСТВОРЕ
НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ARMORACIA RUSTICANA**

Описано несколько вариантов тканевых биосенсоров для определения концентрации перекиси водорода, различающихся по способам иммобилизации растительной ткани *Armoracia rusticana*. Проведен сравнительный анализ этих сенсоров по основным параметрам. Лучшими характеристиками обладает сенсор с растительной тканью, иммобилизованной на фотомембране: диапазон линейности от $9 \cdot 10^{-5}$ до $6 \cdot 10^{-3}$ М при пределе обнаружения перекиси водорода $9 \cdot 10^{-6}$ М, время отклика менее 3 мин, время жизни более 2 мес. В качестве трансдуктора использован кислородный электрод.

Перекись водорода, образующаяся в ходе многих ферментативных реакций, является токсичным веществом и в норме инактивируется каталазой и пероксидазой. При генетически детерминированных патологиях, связанных с изменением активности этих ферментов, происходит накопление H_2O_2 , что приводит к развитию некоторых заболеваний (например, акаталазии) [1]. Известно также, что побочным эффектом определенных фармакологических веществ является их влияние на активность ферментов, катализирующих разложение ряда субстратов (*L*-аминокислот, глюкозы, лактата и др.) с образованием перекиси водорода [2]. Таким образом, определение концентрации H_2O_2 необходимо при постановке диагноза, а мониторинг этого параметра требуется для контроля действия фармакологических препаратов в процессе лечения.

В настоящее время разрабатываются методы определения концентраций биологически значимых веществ в жидких пробах с использованием биосенсоров, в частности тканевых [3]. Для определения концентраций перекиси водорода описаны биосенсоры на основе эритроцитов [4], срезов печени, кольраби, винограда [5, 6, 2].

В данной статье представлены результаты разработки и исследования характеристик биосенсоров для определения концентрации перекиси водорода на основе растительной ткани корней хрена *Armoracia rusticana*.

Методика. Поскольку в ходе реакции разложения перекиси водорода, катализируемой пероксидазой или каталазой, количество образующегося в этой реакции кислорода пропорционально концентрации субстрата, то в качестве трансдуктора необходимо использовать физико-химическую систему, параметры которой зависят от концентрации кислорода.

Был выбран кислородный датчик, работающий по принципу гальванического элемента (пр-во МЭРА-ЭЛЬВРО, Центр вычислительных систем автоматики и измерений, Польша). Устройство датчика приведено на рис. 1. Электроды 1, 2 находятся в растворе электролита, который отделен от исследуемой жидкости тefлоновой мембраной, проницаемой для кислорода. Растворенный в испытуемом образце кислород диффундирует через мембрану в слой электролита между мембраной и поверхностью серебряного катода, где он восстанавливается. Одновременно на аноде протекает реакция окисления

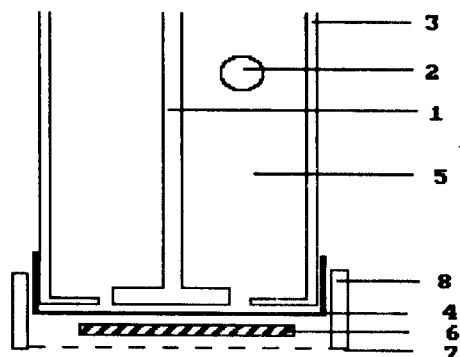


Рис. 1. Схема биосенсора на основе кислородного датчика:

1 — серебряный катод, 2 — цинковый анод, 3 — корпус, 4 — тефлоновая мембрана, 5 — раствор электролита, 6 — иммобилизованная растительная ткань, 7 — нейлоновая сетка, 8 — крепежное кольцо

цинка. В результате этих процессов сила тока, возникающего в элементе, прямо пропорциональна парциальному давлению кислорода, растворенного в тестируемом образце. Кислородный датчик присоединялся к входу высокоомного предвари-

тельного усилителя (MEZ-8201, Nihon Kohden). Сигнал с выхода усилителя подавался на самописец КСП-4. При калибровке кислородного датчика он помещался вначале в бескислородный раствор 5 %-ного сульфита натрия, а затем в насыщенный кислородом бидистиллят.

Растительная ткань использовалась в виде среза (диаметр 10 мм, толщина 0,5 мм) и порошка, полученного из высушенных корней. Были использованы два варианта иммобилизации тканевого порошка: в полиакриламидном геле (Serva, Германия) и на фотомембранах (пр-во Института биоорганической химии СО РАН) [7].

Иммобилизация в геле. Порошок ткани растворялся в буферном растворе геля, добавлялись катализаторы полимеризации. Затем раствор выливался на стеклянную пластину с прокладками толщиной 500 мкм. Сверху накладывалась вторая стеклянная пластина. После окончания полимеризации гель извлекался и разрезался с помощью заточенной стеклянной трубки диаметром 6 мм. Полученные фрагменты помещались на целлофановую пластину, предварительно смоченную в 0,2 М калийфосфатном буфере. Сверху они накрывались второй такой пластиной и высушивались на фильтровальной бумаге под прессом. Перед использованием датчик помещался в калийфосфатный буфер на 15 мин для освобождения от защитной пленки и удаления несвязанных компонентов геля.

Иммобилизация на фоточувствительной мембране. Из фоточувствительной мембраны (диаметр пор 3 мкм) вырезались фрагменты диаметром 6 мм. Порошок ткани растворялся в калийфосфатном буфере и с помощью пипетки наносился на мембрану. После этого мембрана экспонировалась под ртутной лампой ДРШ-250-3 на расстоянии 20 см в течение 10 мин [7].

Изготовленный биологический блок, содержащий ферменты, фиксировался у поверхности тефлоновой мембраны с помощью кольца с нейлоновой сеткой (см. рис. 1). Биосенсор помещался в камеру, заполненную 10 мл 0,2 М калийфосфатного буфера (рН 7.0), куда при непрерывном перемешивании с помощью микропипетки добавлялся определенный объем 3 %-ного раствора перекиси водорода.

Для сравнения различных вариантов конструкции биосенсоров использовались два параметра: максимальный отклик системы на изменение концентрации H_2O_2 от нуля до $9 \cdot 10^{-4}$ М и время отклика, которое оценивалось по времени достижения выходным сигналом 63 % его максимальной величины.

Результаты и обсуждение. В опытах со срезами растительной ткани было показано, что ответ датчика зависит от геометрических параметров среза. Так, при увеличении толщины среза максимальная амплитуда ответа датчика уменьшалась. Если же сравнивать два одинаковых по толщине и диаметру среза, один из которых изготовлен в виде диска, а другой имеет форму кольца, то последний обладает большей чувствительностью и быстродействием (рис. 2). Эти различия обусловлены отличиями условий диффузии кислорода и перекиси в этих датчиках [8].

В связи с тем, что предполагалось иммобилизовать ткань в полиакриламидном геле, были проведены опыты по влиянию самого геля на диффузию

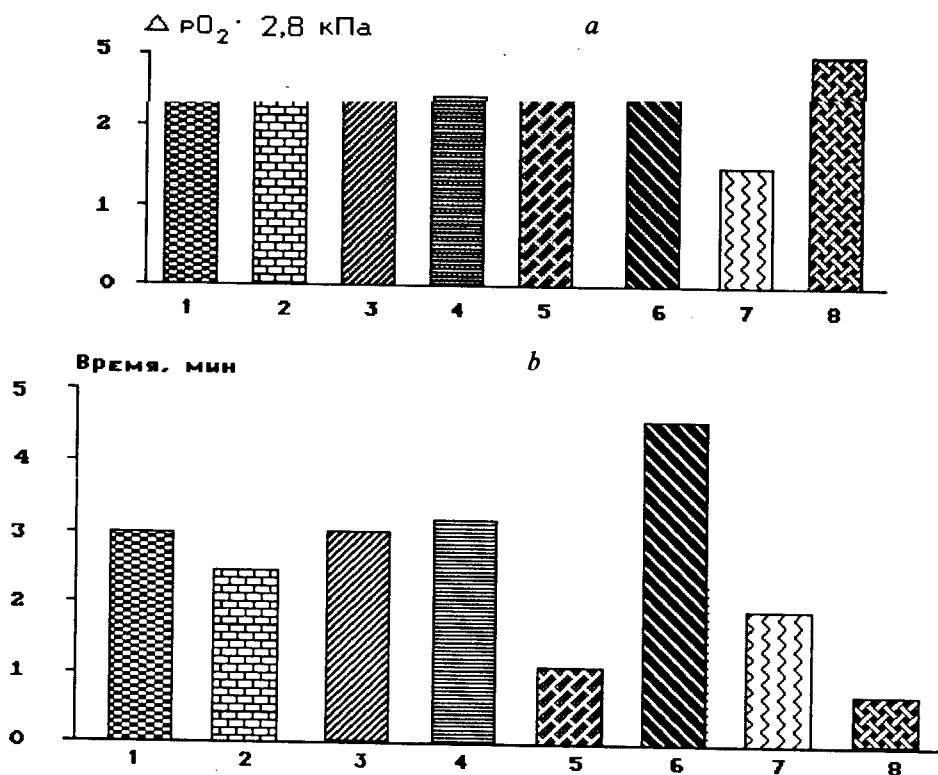


Рис. 2. Максимальный отклик (а) и время отклика (б) биосенсоров при изменении в растворе концентрации перекиси водорода от 0 до $9 \cdot 10^{-4}$ М:

1 — срез корня, 2 — срез в виде кольца, 3 — срез в геле, 4 — порошок ткани в 7 %-ном геле, 5 — порошок ткани в 15 %-ном геле, 6 — порошок ткани, напыленный на фотомембрану, 7 — пероксидаза, иммобилизованная на фотомембране, 8 — супернатант, иммобилизованный на фотомембране

кислорода к мембране датчика. Сравнивая результаты, полученные на intactном срезе и срезе, заключенном в гель (см. рис. 2), можно утверждать, что гель не изменяет условий диффузии для кислорода.

Одним из недостатков датчиков на основе тканевых срезов было небольшое время его жизни. Через двое суток хранения в буферном растворе при комнатной температуре чувствительность биосенсора снижалась более чем в 2 раза (рис. 3).

В следующих опытах использовался порошок высушенной растительной ткани. При использовании порошка во много раз увеличивается площадь контакта субстрата с фрагментами ткани, несущими ферменты, снижается диффузионный барьер. Кроме того, сушка увеличивает время хранения датчика.

Сенсоры, полученные путем иммобилизации порошка в полиакриламидном геле, обладали сравнительно высокой чувствительностью и малым временем отклика, однако время их жизни не превышало 7 дней. Сенсор на основе порошка в 7 %-ном геле был менее стабилен, чем сенсор с тем же порошком, но в 15 %-ном геле (см. рис. 2), вероятно, из-за более интенсивного вымывания ферментативного материала из геля с более низкой концентрацией.

В следующей серии экспериментов для иммобилизации использовались фотомембраны, связывающие биологический материал на своей поверхности

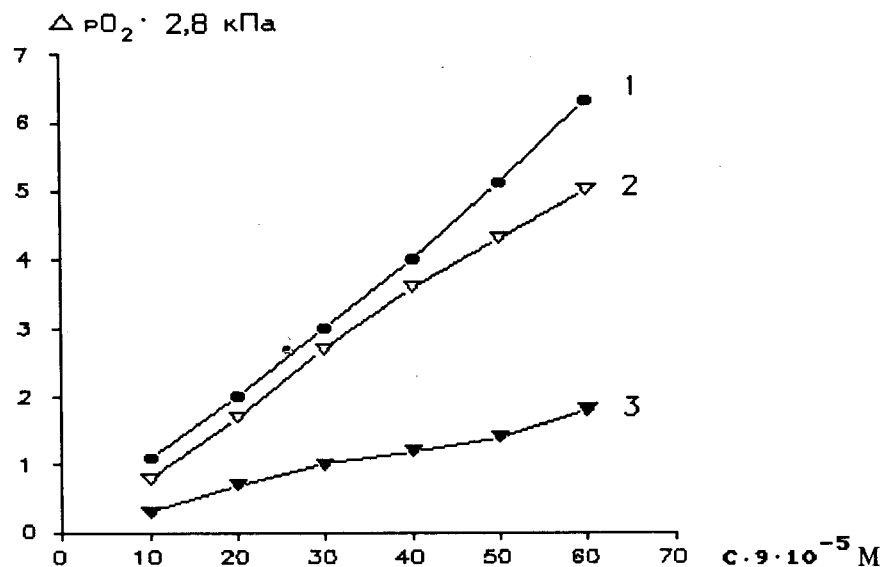


Рис. 3. Калибровочные кривые для среза, иммобилизованного в полиакриламидном геле:

1 — через 1 ч, 2 — через 24 ч, 3 — через 48 ч после иммобилизации

при облучении ультрафиолетом [7]. Характеристики биосенсоров, полученных путем напыления порошка на фотомембрану, были сравнимы с таковыми для датчиков, в которых в качестве иммобилизата использовался полиакриламидный гель (см. рис. 2), а по времени жизни (более 2 мес.) эти датчики превосходили все вышеописанные (рис.4). Необходимо отметить, что не применялось никаких специальных мер для увеличения времени жизни биосенсора: датчик находился в буферном растворе при комнатной температуре и не подвергался обработке консервантами.

Для улучшения характеристик данного типа датчиков вместо сухого порошка на поверхность фотомембраны иммобилизовался супернатант, полученный при центрифугировании раствора порошка в калийфосфатном буфере (см. рис. 2). При калибровке такого датчика было найдено, что ответ

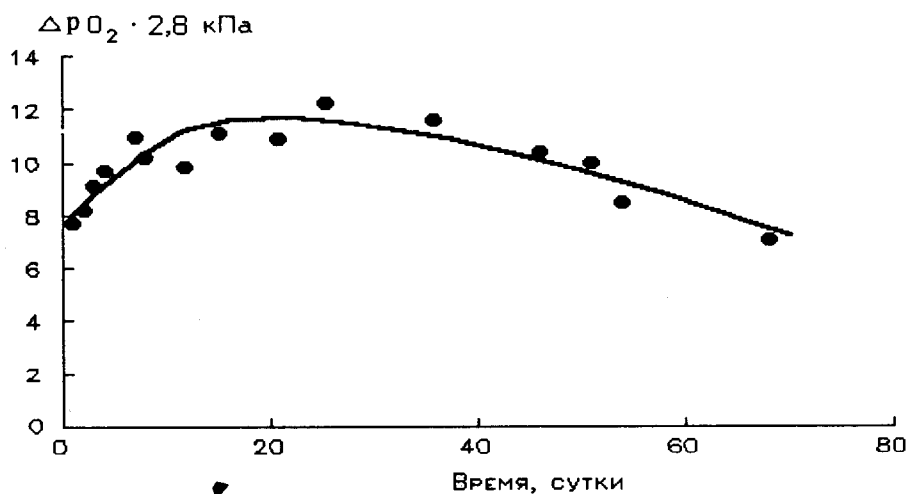


Рис. 4. Зависимость чувствительности биосенсора (супернатант иммобилизован на фотомембране) от времени

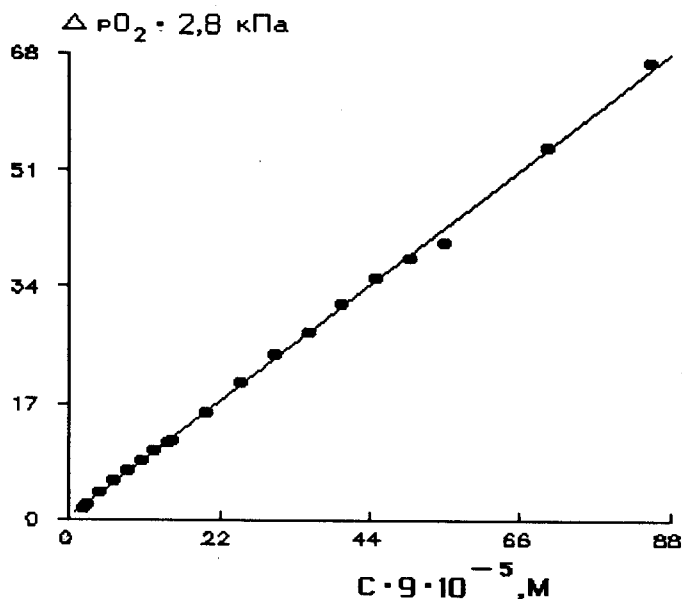


Рис. 5. Калибровочная кривая биосенсора, полученного путем иммобилизации супернатанта порошка на фотомембране

датчика линеен в диапазоне концентраций от $9 \cdot 10^{-5}$ до $6 \cdot 10^{-3}$ М при пределе обнаружения перекиси водорода $9 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 5).

Для определения воспроизводимости технологии приготовления биосенсоров определялся отклик каждого датчика из полученной партии на $9 \cdot 10^{-4}$ М раствор перекиси водорода. В этих опытах показатель точности, определяемый как отношение выборочной ошибки к своей средней арифметической [9], для группы датчиков ($n = 23$) составил 2,3 %.

Показатель точности, найденный для характеристики воспроизводимости анализа с помощью одного биосенсора, составил 2,6 % ($n = 13$).

Для сравнения разработанного тканевого биосенсора с ферментативным был сделан датчик, содержащий иммобилизованную на фотомембране пероксидазу (Sigma, США). Сравнение характеристик такого датчика с тканевым (см. рис. 2) свидетельствует о том, что либо иммобилизация в ткани позволяет сохранить более высокую активность ферментов, либо значительный вклад в реакцию сенсора вносит каталаза, также содержащаяся в растительных тканях [10].

При исследовании влияния величины рН на чувствительность датчика регистрировался отклик биосенсора в растворах с разными значениями рН на смещение концентрации H_2O_2 от нуля до $9 \cdot 10^{-4}$ М. Зависимость чувствительности датчика (рис. 6) соответствует рН-зависимости ферментативной активности для каталазы и пероксидаз: максимум наблюдается при рН 7—7.2.

При определении специфичности полученного биосенсора использовались вещества, биохимические превращения которых сопровождаются выделением или поглощением кислорода либо продуцированием перекиси (глюкоза в концентрации — 50, глицин — 10, этанол — 80, ацетон — 20, мочевины — 50 мМ). Ответ датчика на глюкозу по абсолютному значению амплитуды составил около 2 % от соответствующей реакции на $9 \cdot 10^{-4}$ М H_2O_2 , на другие вещества датчик не реагировал.

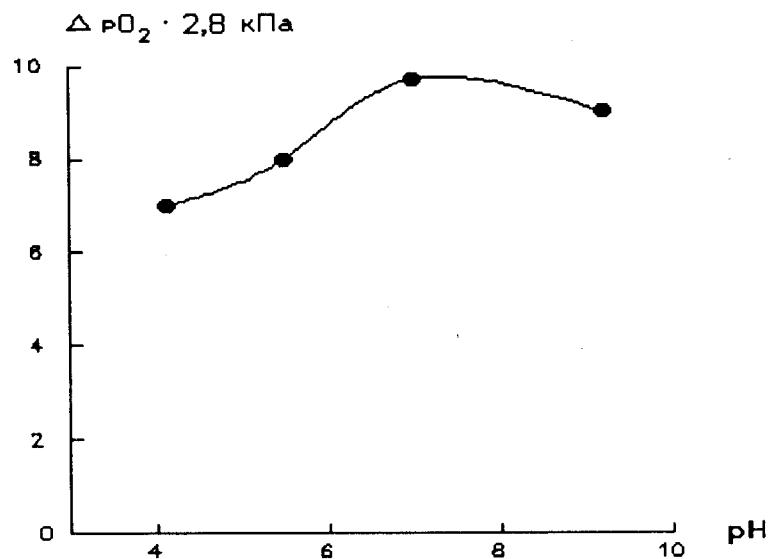


Рис. 6. Влияние pH-среды на чувствительность биосенсора (супернатант иммобилизован на фото-мембране)

ВЫВОДЫ

Использование в биосенсорах растительной ткани позволяет обойтись без сложных и трудоёмких процедур выделения и очистки ферментов и значительно сокращает материальные затраты на создание таких датчиков, связанные с покупкой коммерческих ферментативных препаратов.

Описанные биосенсоры могут быть использованы не только для измерения концентрации перекиси водорода. На их основе возможна разработка целого комплекса комбинированных биосенсоров для определения субстратов, в результате реакций разложения которых (катализируемых их оксидазами) образуется перекись водорода — *L*-аминокислоты, глюкоза, лактат и др.

Проведение данной работы финансировалось научно-техническим центром «Растр» г. Новосибирска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wyngaarden I., Howell R. Metabolic Bases of Inherited Disease.—N.-Y. a. o., 1966.
- Weiezuriga P., Lin M. S., Rechnitz G. A. Grape tissue-based electrochemical sensor for determination of hydrogen peroxide // *Anal. Chim. Acta.*—1990.—234, N 2.—P. 453.
- Rechnitz G. A., Ho M. Y. Biosensors based on cell and tissue material // *J. of Biotechnology.*—1990.—15, N 3.—P. 201.
- Racek J., Petr R. Biosensors for determination of hydrogen peroxide based on catalase activity of human erythrocytes // *Anal. Chim. Acta.*—1990.—239, N 11.—P. 19.
- Mascini M., Iannello M., Palleschi G. A liver tissue-based electrochemical sensor for hydrogen peroxide // *Anal. Chim. Acta.*—1982.—138, N 1.—P. 65.
- Lu C., Shan L. M., Minori H., Rechnitz G. A. Kofirabi-based amperometric biosensor for hydrogen peroxide measurement // *Anal. Lett.*—1991.—24, N 1.—P. 1.
- Добриков М. И., Шишкин Г. В. *n*-Азидотетрафторбензальдегид — высокоэффективный гетеробифункциональный реагент для фотоиммобилизации ферментов // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.*—1990.—Вып. 6.

8. Uchiyama S., Rechnitz G. A. Biosensors using flowers as a catalytic material // Anal. Lett.—1987.—20, N 3.—P. 451.
9. Лакин Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. шк., 1980.
10. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии.—М.: Мир, 1981.—Т. 1.

Поступила в редакцию 18 февраля 1993 г.

Реклама продукции в нашем журнале — залог Вашего успеха!