

Біосенсор на основі уреазы з покращеною чутливістю для аналізу іонів важких металів

О. П. Солдаткін

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

Потенціометричний біосенсор, який складається з двох іонселективних польових транзисторів (ІСПТ) та іммобілізованого ферменту уреазы, може бути використаний для кількісного визначення концентрації іонів важких металів. Після преінкубації сенсора в модельному розчині інгібітора (CuCl_2) відгук сенсора після пригнічення і відповідно залишкову ферментативну активність вимірювали в трис-НСІ-буфері, рН 7,4. Було показано, що чутливість біосенсора до концентрації інгібітора сильно залежить від методу іммобілізації уреазы. Максимальною чутливістю при визначенні концентрації CuCl_2 відзначався біосенсор, у якому ферментна та референтна мембрани були покриті плівкою із негативно зарядженого полімеру Nafion.

Вступ. Вивчення, розробка та використання біосенсорів для кількісного та якісного визначення токсичних речовин в останні 10—15 років набули значного розвитку. Це зумовлено тим, що аналітичні системи на основі біосенсорів прості, дешеві, чутливі та швидкодіючі [1—4]. Недавно показано, що біосенсори на основі уреазы можна використовувати в інгібіторному аналізі для кількісного визначення концентрацій іонів важких металів [3, 4]. Але в деяких випадках чутливість таких біосенсорів до токсичних речовин як інгібіторів недостатня, тому дуже важливо знайти підходи для її підвищення. Саме цій проблемі і присвячена дана робота, в якій представлено підхід для покращання чутливості уреазного потенціометричного біосенсора до іонів важких металів.

Матеріали і методи. В роботі використано уреазу (ЕС 3.5.1.5) з активністю 31 од. мг^{-1} та 25 %-й розчин глутарового альдегіду, отримані з фірми «Fluka» (Швейцарія), бичачий сироватковий альбумін (БСА) та трис з фірми «Merck» (Німеччина), полі(4-вінілпіридинкостирен) (продукт № 19.207-4) та Nafion (продукт № 27.470-4) були поставлені фірмою «Aldrich» (США). Всі інші солі та реагенти були аналітичної чистоти.

Іммобілізація ферменту. Мембрану, що містила іммобілізований фермент, та референтну фор-

мували наступним методом. Краплю розчину, який вміщував 5 % уреазы, 5 % БСА та 10 % гліцерин у 5 мМ трис-НСІ-буфері (рН 7,4), було нанесено на чутливу область одного з двох іонселективних польових транзисторів (ІСПТ) диференційної пари. На інший ІСПТ цієї ж пари (контрольний) наносили краплю суміші, яка містила 10 % БСА і 10 % гліцерин у тому ж самому буфері. Після цього сенсорний чип поміщали на 30 хв в насичені пари глутарового альдегіду, а потім просушували при кімнатній температурі протягом 15—20 хв. Для формування додаткових мембран 1 мкл 0,5 %-го розчину полімеру (ПВП чи Nafion) в етанолі наносили поверх ферментної та референтної мембран і просушували на повітрі при кімнатній температурі протягом 5—10 хв.

Методика вимірювання концентрації інгібітора. Оригінальний прилад, виготовлений в нашій лабораторії, схема якого представлена на рис. 1, використано для вимірів змін поверхневого потенціалу на ІСПТ, викликаних локальною зміною рН у біомембрані. Диференційний сигнал знімали з робочого (покритего ферментною мембраною) та референтного ІСПТ і підсилювали. Локальні зміни рН на робочому транзисторі були спричинені ферментативним гідролізом сечовини. Пригнічення уреазы іонами важких металів призводило до зменшення сенсорного відгуку і служило мірою їх концентрації в аналізованому розчині.

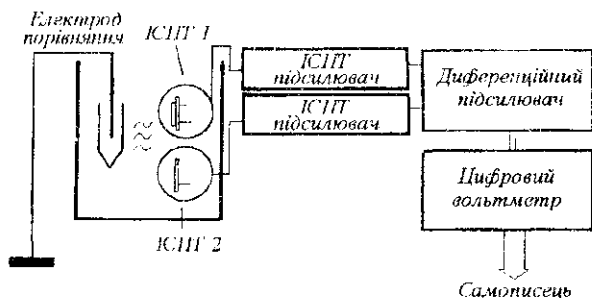


Рис. 1. Блок-схема установки для потенціометричних вимірювань за допомогою іонселективних польових транзисторів

По-перше, в оптимальних умовах [5] визначали відгук біосенсора на 10 мМ сечовину (концентрація, що забезпечує максимальну величину сигналу біосенсора). Потім сенсор відмивали від субстрату і занурювали на певний час в аналізований модельний розчин, який містив іони міді. Після відмивки біосенсора буферним розчином знову тестували відгук сенсора на 10 мМ сечовину. Різниця сигналів до і після інгібування ферменту була пропорційною концентрації інгібітора та часу преінкубації сенсора в розчині з інгібітором.

Виміри проводили при кімнатній температурі в скляній комірці (1,5 мл), заповненій робочим буфером (5 мМ трис-НСІ, рН 7,4), при інтенсивному перемішуванні.

Результати та обговорення. Раніше було показано, що уреаза в вільному та іммобілізованому стані може пригнічуватися іонами важких металів [3, 4]. Але чутливість вільного та іммобілізованого ферменту до інгібування була різною. В даній роботі біосенсори модифікували за допомогою нанесення додаткових заряджених полімерів поверх ферментної та референтної мембран і вивчали чутливість таких сенсорів до концентрації іонів важких металів на прикладі іонів міді. Максимальний відгук біосенсора на 10 мМ концентрацію сечовини вимірювали в 5 мМ трис-НСІ-буфері (рН 7,4) (стаціонарний режим вимірювань при концентрації субстрату, що відповідає насиченню) до і після інкубації біосенсора в модельному водному розчині CuCl_2 .

Результати пригнічення відгуку сенсора іонами міді, отримані для ензимного польового транзистора (ЕНПТ) з уреазою, іммобілізованою в БСА-мембрані, з модифікацією додатковими шарами заряджених полімерів (ПВП та Nafion) і без неї, представлені на рис. 2. Полімери ПВП та Nafion було використано для модифікації уреазного ЕНПТ як додаткові заряджені (позитивно та негативно)

шари, щоб перевірити їх вплив на чутливість сенсора до іонів важких металів. Раніше було показано в [6], що позитивно заряджена ПВП додаткова мембрана захищає біосмбрану від впливу позитивно заряджених іонів (включаючи катіони металів). Тому було зроблено припущення стосовно того, що негативно заряджена мембрана (наприклад, Nafion) може викликати зворотний ефект, акумулюючи катіони в ферментній мембрані та підвищуючи таким чином чутливість сенсора до іонів важких металів. Отримані експериментальні результати підтвердили таке припущення. Так, в ряду чутливості до іонів важких металів біосенсор, модифікований негативно зарядженою додатковою мембраною з Nafion-полімеру, характеризувався максимальною чутливістю, сенсор без додаткових мембран — середньою, а ЕНПТ, модифікований позитивно зарядженою ПВП-мембраною, відзначався найнижчою чутливістю.

У наступних експериментах було показано, що пригнічення уреазі іонами міді було умовно незворотним. Так, відмивання біосенсора від інгібітора дистильованою водою чи робочим буфером не призводило до відновлення активності сенсора. Однак короткочасне вимочування (близько 10 хв) уреазного біосенсора в розчині з 10 мМ ЕДТА спричинювало повне відновлення величини відгуку біосенсора, що давало можливість повторного використання сенсора щонайменше 10 разів з хорошою відтворюваністю вимірів (похибка не перевищувала 10 %). Між вимірами сенсори зберігали в сухому стані в холодильнику при температурі 4—6 °С і

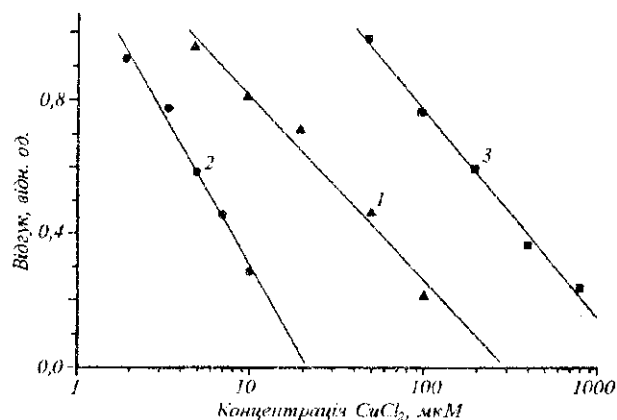


Рис. 2. Залежність відгуку уреазного біосенсора від концентрації CuCl_2 . Сенсори з Nafion (1) чи ПВП (3) додатковими полімерними шарами; 2 — сенсор, не модифікований додатковими мембранами. Час преінкубації з інгібітором 5 хв

останні демонстрували хорошу стабільність протягом одного місяця.

Заключення. На основі уреаз та іоноселективних польових транзисторів було розроблено біосенсор багаторазового використання для визначення іонів важких металів як інгібіторів ферменту. Показано принципову можливість впливу на його чутливість до інгібітора (як у бік підвищення, так і зниження) через використання заряджених полімерних матеріалів як додаткових шарів, нанесених поверх ферментної та референтної мембран. Біосенсор, модифікований негативно зарядженою мембраною з Nafion, характеризувався максимальною чутливістю до іонів міді.

Частина цієї роботи було виконано завдяки фінансовій підтримці Міністерства в справах науки та технологій (проект № 5.4/74 Державного фонду фундаментальних досліджень).

А. П. Солдаткин

Биосенсор на основе уреазы с улучшенной чувствительностью для анализа ионов тяжелых металлов

Резюме

Потенциометрический биосенсор, состоящий из двух ионселективных полевых транзисторов (ИСПТ) и иммобилизованного фермента уреазы, может быть использован для количественного определения концентраций ионов тяжелых металлов. После преинкубации сенсора в модельном растворе ингибитора (CuCl_2) отклик сенсора после ингибирования и соответственно остаточную ферментативную активность измеряли в трис-НСI-буфере, рН 7,4. Показано, что чувствительность биосенсора к концентрациям ингибитора сильно зависит от метода иммобилизации уреазы. Максимальной чувствительностью при определении концентраций CuCl_2 характеризовался биосенсор, в котором уреазы была иммобилизована под пленкой отрицательно заряженного полимера Nafion.

A. P. Soldatkin

Urease-based biosensor with improved sensitivity for heavy metal ions analysis

Summary

Potentiometric biosensors which consist of two ISFET structures covered with immobilized enzyme (urease) can be used for quantitative estimation of water pollution with heavy metal ions. The measurements of the residual enzyme activity have been carried out in Tris-HCl buffer (pH 7.4) after preincubation in model CuCl_2 solution. It was shown that sensor sensitivity to inhibitor concentration depends strongly on enzyme immobilization method. The lowest detection limit has been obtained for urease biosensor modified by negatively charged additional Nafion membrane.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Tranh-Minh C.* Immobilized enzyme probes for determining inhibitors // *Ion-Selective Electrode Rev.*—1985.—7.—P. 41—75.
2. *Gaye J., Haouz A., Geloso-Meyer A., Burstein C.* Detection of heavy metal salts with biosensor built with an oxygen electrode coupled to various immobilized oxidases and dehydrogenases // *Biosensors and Bioelectronics.*—1993.—8.—P. 177—183.
3. *Krajewska B.* Urease immobilized on chitosan membrane. Inactivation by heavy metal ions // *J. Chem. Tech. Biotechnol.*—1991.—52.—P. 157—162.
4. *Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I. et al.* Application of urease conductometric biosensor for heavy metal ion determination // *Sensors and Actuators B.*—1995.—24—25.—P. 145—148.
5. *Солдаткин А. П., Бубряк О. А., Стародуб Н. Ф. и др.* Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // *Журн. аналит. химии.*—1993.—29, № 3.—С. 315—319.
6. *Volotovskiy V., Soldatkin A. P., Snu'ga A.A. et al.* Glucose-sensitive ISFET-based biosensor with additional positively membrane // *Anal. Chim. Acta.*—1996.—322.—P. 77—81.

УДК 577.15; 573.6

Надійшла до редакції 21.10.97