

Комплекс α_2 -макроглобулін—трипсин як чутливий елемент потенціометричного біосенсора для опосередованого кількісного визначення протеїназ

О. А. Белоиван, А. П. Солдаткин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Изучена возможность использования комплекса α_2 -макроглобулин (α_2M)—трипсин в качестве чувствительного элемента потенциометрического биосенсора для опосредованного количественного определения протеиназ по их эстеразной активности при гидролизе *N* α -бензоил-L-аргинин этилового эфира (ВАЕЕ). Оптимизированы условия иммобилизации комплекса α_2M —трипсин на поверхность рН-чувствительного полевого транзистора в насыщенных парах глутарового альдегида. Изучены свойства разработанной мембраны. Определены оптимальные условия для измерения гидролиза ВАЕЕ с помощью полученного на ее основе датчика. Показана принципиальная возможность определения концентрации ВАЕЕ в области 0,1–1,0 мМ и трипсина в области 0,1–30 ед. акт/мл. Сделан вывод о перспективности использования разработанной мембраны в качестве чувствительного элемента потенциометрического биосенсора.*

Введение. Как известно, при гидролизе синтетических эфирных субстратов с участием трипсиноподобных протеиназ происходит образование протона, которое может быть зарегистрировано, в частности, с помощью рН-чувствительного полевого транзистора (рН-ПТ). На этом принципе ранее были разработаны макеты энзимосенсоров с использованием иммобилизованного в альбуминовую гелевую пленку на поверхность затвора рН-ПТ трипсина или химотрипсина, позволяющие определять концентрации эфирных субстратов протеиназ в буферных растворах [1, 2].

Подобные датчики можно применять для прямого определения концентрации сериновых протеиназ в биологических и других жидкостях следующим образом: после получения стационарного исходного сигнала датчика (dU_0) на определенную концентрацию субстрата, которая не является насыщающей, вносят аликвоту тестируемого раствора (рис. 1). При наличии в нем протеиназ субстрат в растворе подвергается дополнительному

гидролизу (поскольку эта реакция происходит не в мембране на поверхности датчика, а в растворе, то образующийся при этом протон не регистрируется в дифференциальном режиме измерения) и его концентрация падает. Соответственно снижается величина сигнала биосенсора (dU_i). Регистрируемое изменение сигнала ($dU_0 - dU_i$) может служить мерой активности внесенных протеиназ при наличии линейной зависимости между названными величинами. Такая зависимость будет наблюдаться лишь при условии, что мембрана биосенсора защищена от протеолиза (автолиза) и ингибирования и, следовательно, не меняет своей активности при взаимодействии с анализируемой средой.

Кроме того, оптимальные условия работы иммобилизованного и свободного фермента должны совпадать.

Одним из вариантов решения упомянутых проблем, на наш взгляд, может быть использование в качестве активного элемента биосенсора не самого фермента, а его комплекса с ингибитором протеиназ α_2 -макроглобулином (α_2M), обладающим рядом уникальных свойств.

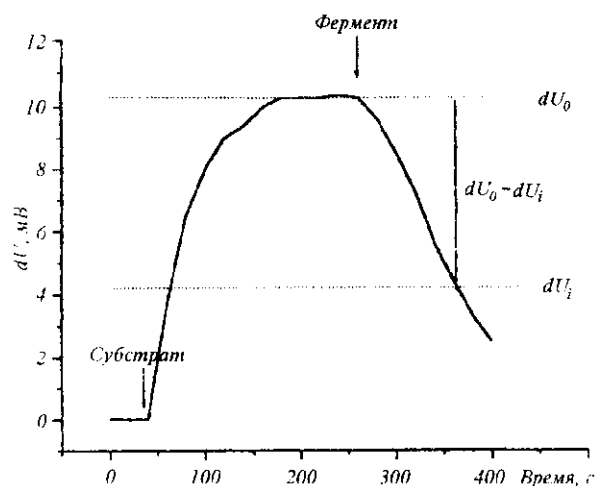


Рис. 1. Общий вид регистрируемого сигнала рН-ПТ с иммобилизованной мембраной, содержащей комплекс трипсин— α_2 М. Внесение субстрата ВАЕЕ и трипсина указано стрелками. Мембрана сформирована из раствора, содержащего 8 % суммарного белка при молярном соотношении трипсин: α_2 М 2:1, 10 % глицерина; время инкубации в парах ГА — 40 мин. Инкубацию проводили при 19 °С. Измерения осуществляли в 10 мМ фосфатном буфере, рН 8,0, при 25 °С. Конечная концентрация вносимого ВАЕЕ в растворе 0,4 мМ, трипсина — 7,4 мкг/мл

Известно, что α_2 М — высокомолекулярный гликопротеин плазмы крови, функционирующий как ингибитор всех классов протеиназ. Особенностью его взаимодействия с ферментами является то, что их активный центр в этом случае остается свободным. Протеиназа ковалентно присоединяется к особому участку в молекуле α_2 М в результате трехстадийного процесса, ведущего к образованию более компактной структуры. Считают, что комплексы протеиназа— α_2 М стабильны и не диссоциируют. Они сохраняют способность гидролизовать низкомолекулярные субстраты, но в то же время не взаимодействуют с высокомолекулярными субстратами, ингибиторами, антителами [3—5].

На сегодняшний день в ряде работ показаны возможности практического использования α_2 М для иммобилизации различных ферментов, а также в качестве потенциального носителя ферментов для энзимотерапии [6, 7], однако в литературе нами не обнаружено попыток его использования в сенсорной технологии.

Следует отметить, что наиболее подробно изучен гидролиз субстратов с участием комплекса α_2 М с трипсином, который применен в данной работе как модельный. Большинство белков либо устойчивы к действию α_2 М-связанного трипсина (альбумин, миозин, фибриноген), либо расщепляются им

слабо (казеин, гемоглобин, инсулин) [3, 5]. В то же время синтетические низкомолекулярные субстраты, а также щелочной белок протамин гидролизуются α_2 М-связанным трипсином со скоростью, аналогичной таковой для свободного фермента [3]. Кроме того, трипсин в комплексе с α_2 М приобретает устойчивость к автолизу и действию других белковых ингибиторов (α_1 -ИП, ингибитору из бобов сои) [3, 4]. Естественно также предположить, что включение трипсина в α_2 М будет защищать его от денатурации при проведении иммобилизации. В представленной работе использован метод иммобилизации шивкой в насыщенных парах глутарового альдегида, который зарекомендовал себя как технологичный и эффективный при создании различных (в том числе и на основе трипсина) энзимосенсоров [8].

Процесс разработки чувствительной мембраны биосенсора включал в себя такие этапы: 1) выбор способа формирования мембраны; 2) оптимизацию состава мембраны, а также условий иммобилизации комплекса трипсин— α_2 М; 3) изучение основных свойств полученной мембраны и их изменения при хранении; 4) оптимизация условий количественного определения протеиназ в растворах.

Материалы и методы. В работе использовали трипсин (ЕС 3.4.21.4) из поджелудочной железы быка фирмы «Calbiochem» (США), α_2 -макроглобулин (Россия), соевый ингибитор трипсина (STI) («Reanal», Венгрия), гидрохлорид, N α -бензоил-L-аргинин этилового эфира (ВАЕЕ), бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид (BAPNA), 25 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) фирмы «Pharmacia Ltd» (Великобритания) и другие реактивы производства стран СНГ квалификации «хч» и «осч».

«Универсальный» (рН 6,0—9,0) трис-НСl (рН 7,7) и фосфатный буфера (рН 7,6; 8,0) готовили, как описано ранее [8].

Формирование мембраны, содержащей комплекс α_2 М—трипсин. Методика 1. Связывание трипсина из раствора иммобилизованным α_2 М. α_2 М иммобилизовали из смеси, содержащей 5 мг ингибитора на 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,6) и 2,5 %-го глицерина. Смесь наносили капельным методом под микроскопом на поверхность затвора рН-ПТ или на поверхность керамических пластин, покрытых SiO₂ и Si₃N₄, площадью 0,25 см³ и толщиной 0,5 мм (для биохимического контроля). Иммобилизацию осуществляли инкубацией в парах ГА в течение 30—60 мин при комнатной температуре. Затем мембраны высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 40 мин

и отмывали 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,6) (30 мин), высушивали и погружали в раствор трипсина (0,5 мг/мл) в том же буфере. После инкубации на протяжении 30 мин при температуре 25 °С процедуру отмывки повторяли трижды по 5 мин. Остаточный свободный трипсин, который мог сорбироваться на поверхность, инактивировали раствором STI (0,5 мг/мл) в том же буфере в течение 15 мин. Затем пластины или датчики еще трижды отмывали буферным раствором.

Методика 2. Иммуобилизация комплекса трипсин- α_2 М. Для проведения иммуобилизации готовили смесь из двух растворов: 1) 5 мг α_2 М растворяли в 100 (10 %-й раствор) или в 50 мкл (5 %-й раствор) 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,6); 2) 1,4 мг трипсина растворяли в тех же объемах 2,5 мМ HCl. Далее 5 мкл второго раствора добавляли к первому и инкубировали в течение 15 мин при 25 °С для образования комплекса α_2 М-трипсин в молекулярном соотношении 1:2.

При изучении влияния стабилизирующих добавок на активность мембран перед проведением иммуобилизации в смесь добавляли глицерин (2,5—10 %) и аккуратно перемешивали. Исходный раствор наносили капельным методом под микроскопом на поверхность затвора рН-ПТ или на поверхность керамических пластин, покрытых SiO₂ и Si₃N₄, площадью 0,25 см² и толщиной 0,5 мм (для биохимического контроля). Иммуобилизацию осуществляли инкубацией в парах ГА в течение заданного времени при температуре 19 °С. Затем мембраны высушивали на воздухе при комнатной температуре на протяжении 40 мин и отмывали 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,6) при постоянном перемешивании в течение 30 мин, инкубировали в растворе трипсина (0,5 мг/мл, 15 мин) и промывали в буферном растворе. Остаточный свободный трипсин инактивировали раствором STI (0,5 мг/мл) в том же буфере (15 мин). Затем пластины или датчики еще трижды отмывали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,6).

Определение активности мембран. Активность мембран, сформированных на поверхности затвора рН-ПТ, контролировали по величине сигнала датчика на внесенный субстрат ВАЕЕ, как описано ранее [2]. Конструкция сенсора на основе рН-ПТ, а также измерительная схема описаны ранее [9]. Параллельно определяли активности исходных смесей для формирования мембран и самих мембран, сформированных на керамических пластинах, покрытых SiO₂ и Si₃N₄, по величине оптической плотности в реакции с хромогенным субстратом BAPNA [8].

Определение адгезии матриц к поверхности. Адгезию матриц к поверхности преобразователя оценивали визуально по методу [8]. Относительная единица адгезии соответствует 100 %-му сохранению мембран на поверхности керамических пластин после их встряхивания в буферном растворе в течение 24 ч.

Определение активности свободного трипсина проводили по методу Шверта и Такенака [10] с небольшими модификациями с использованием в качестве субстрата ВАЕЕ. К 0,2 мл исследуемого раствора прибавляли 3,0 мл 0,001 М раствора субстрата в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,6). Экстинкцию полученного раствора измеряли против раствора субстрата при 253 нм. Термостатировали пробу в течение 5 мин при 25 °С, после чего снова измеряли экстинкцию. Удельную активность испытуемого препарата определяли по формуле

$$A_{уд} = (\Delta A_{253}) / (0,001 \cdot 5 \cdot q),$$

где ΔA_{253} — изменение оптической плотности за время инкубации; 5 — время реакции в минутах; q — количество белка в пробе (мг), и выражали в ВАЕЕ единицах на 1 мг белка (одна единица соответствует изменению оптической плотности на 0,001). Количество белка в пробе контролировали по методу Брэдфорда [11].

Результаты и обсуждение. В начале работы нами была рассмотрена возможность получения активной мембраны энзимосенсора путем иммуобилизации α_2 М на кремниевой поверхности в парах ГА с последующим проведением реакции комплексообразования иммуобилизованного α_2 М с трипсином из раствора. Такой способ иммуобилизации способствует максимальному сохранению свойств фермента, поскольку последний не подвергается повреждающему воздействию паров ГА. Преимуществом такого варианта создания мембраны является также возможность полностью связать активный α_2 М с трипсином в сформированной мембране. Избыточный свободный фермент может быть легко удален из мембраны промывкой ее в буфере и инактивирован раствором STI. Однако из-за частичной инактивации α_2 М при иммуобилизации и наличия стерических ограничений для реакции α_2 М с трипсином мембрана может быть недостаточно активной.

Иммуобилизацию проводили на поверхность затвора рН-ПТ согласно методике 1, описанной в разделе «Материалы и методы». Наличие ферментативной активности иммуобилизованного комплекса подтверждали в цветной реакции с BAPNA, а также по величине сигнала датчика. На рис. 2, а, представлена зависимость величины сигнала полу-

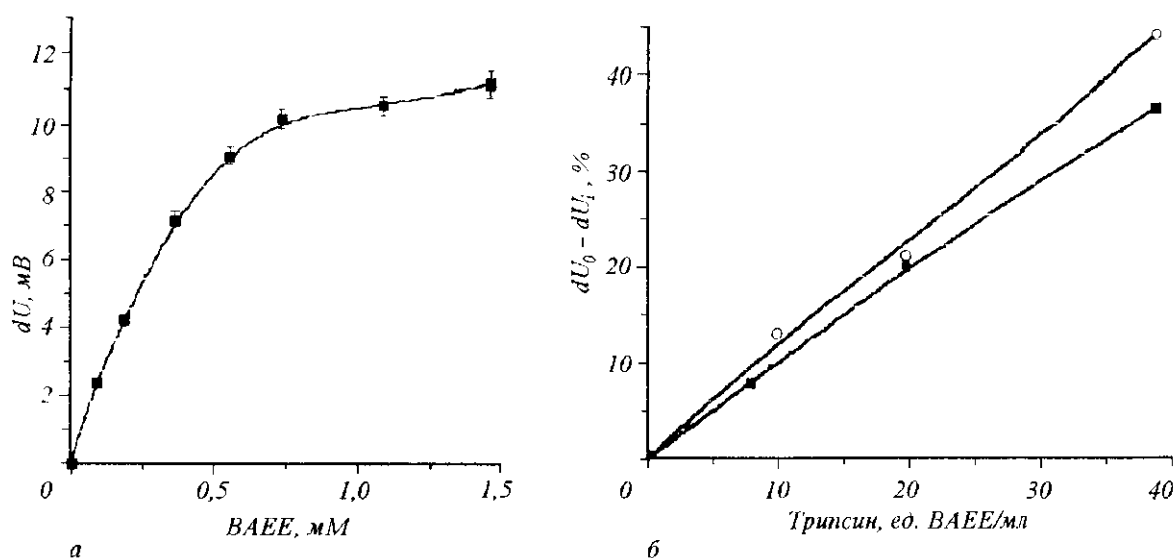


Рис. 2. Калибровочные кривые определения ВАЕЕ (а) и трипсина (б), полученные с помощью датчика на основе рН-ПТ, содержащего мембрану, иммобилизованную по методике 1 (см. «Материалы и методы»). Измерения проводили в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 7,7, при 25 °С. Изменения сигнала датчика в зависимости от концентрации внесенного раствора трипсина приведены в % от исходного стационарного сигнала на 0,4 мМ ВАЕЕ

ченного энзимосенсора от концентрации ВАЕЕ. Показано наличие линейной зависимости величины сигнала датчика от концентрации внесенного субстрата в пределах 0,1–0,7 мМ. Результаты измерений демонстрируют принципиальную возможность определения ВАЕЕ с использованием иммобилизованного комплекса трипсин– α_2 М в составе биосенсора. При добавлении в измерительную ячейку раствора трипсина после получения исходного стационарного сигнала на концентрацию ВАЕЕ 0,4 мМ, при которой изменение величины отклика сенсора линейно зависит от концентрации субстрата (рис. 2, а), было продемонстрировано наличие линейной зависимости между величиной изменения исходного сигнала датчика и концентрацией добавленного трипсина в диапазоне 0,1–40 ед. ВАЕЕ/мл (рис. 2, б). Однако при таком способе формирования мембраны не исключена возможность конкурентного связывания иммобилизованного α_2 М с определяемыми ферментами в процессе проведения измерений, поскольку, по литературным данным, независимо от концентрации трипсина степень ковалентного связывания с α_2 М для него составляет 60–70 %, остальная же часть фермента удерживается за счет нековалентных связей [3]. Поэтому была изучена возможность создания активной мембраны биосенсора за счет ковалентного связывания комплекса α_2 М–трипсин.

Очевидно, что при формировании мембраны

сенсора путем иммобилизации α_2 М-связанного трипсина из раствора важно, чтобы в мембране отсутствовала остаточная активность свободного ингибитора и фермента. Поскольку известно, что одна молекула α_2 М может максимально связывать лишь две молекулы трипсина [3–5], мембрану формировали при молярном соотношении компонентов трипсин: α_2 М 2:1, затем ее инкубировали в растворе трипсина для связывания оставшегося свободным α_2 М, отмывали, а возможный избыток трипсина инактивировали с помощью STI.

Для выбора оптимальных условий иммобилизации варьировали содержание суммарного белка в мембране и время ее инкубации в парах ГА при температуре 19 °С, а также концентрацию глицерина, который использовали в качестве стабилизирующей добавки и для предотвращения высыхания мембраны в процессе иммобилизации [8]. Мембраны формировали на поверхности затвора рН-ПТ и измеряли зависимость величины сигнала датчика (служащего критерием активности мембраны) от концентрации внесенного субстрата ВАЕЕ. Результаты измерений представлены на рис. 3, а. Показано, что при сокращении времени инкубации в парах ГА активность мембран существенно возрастала (рис. 3, а, кривые 1, 2, 4 — раствор для формирования мембраны содержал 4 % суммарного белка; а также кривые — 5, 3 раствор для формирования мембраны содержал 8 % суммарно-

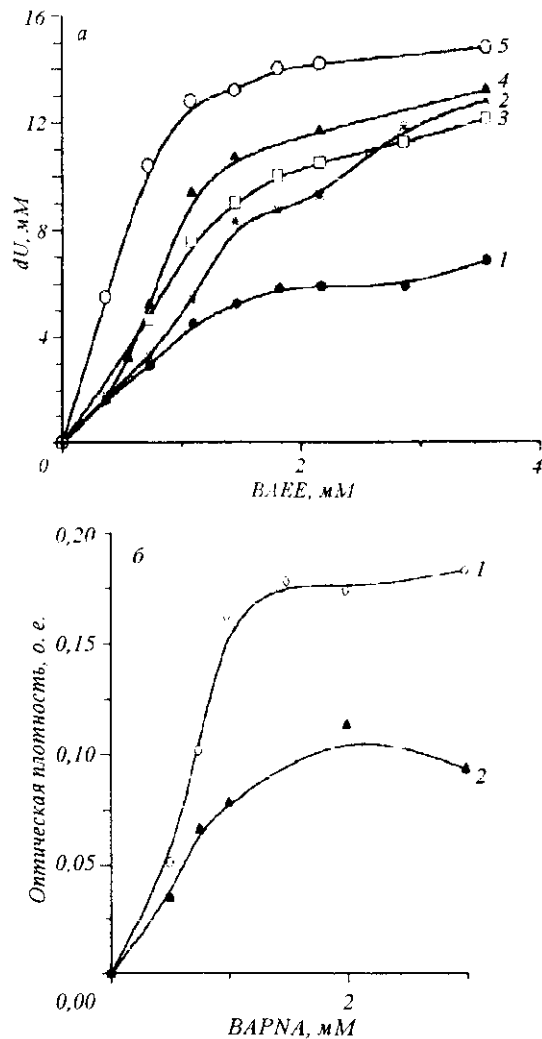


Рис. 3. Влияние условий иммобилизации комплекса трипсин— $\alpha_2\text{M}$ на активность полученных мембран: *a* — зависимости величины сигнала датчиков на основе рН-ПТ и комплекса трипсин— $\alpha_2\text{M}$, полученных при различных условиях иммобилизации, от концентрации ВАЕЕ (измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,5) при 25 °С; 1, 2, 4 — мембраны формировали из раствора, содержащего 4 % суммарного белка при молярном соотношении трипсин: $\alpha_2\text{M}$ 2:1, 10 % глицерина; время инкубации в парах ГА — 60, 40, 20 мин соответственно; инкубацию проводили при 19 °С; 3, 5 — мембраны формировали из раствора, содержащего 8 % суммарного белка при молярном соотношении трипсин: $\alpha_2\text{M}$ 2:1, 10 % глицерина; время инкубации в парах ГА — 60, 40 мин соответственно; инкубацию проводили при 19 °С); *б* — сравнительное определение активности $\alpha_2\text{M}$ -связанного трипсина в растворе (1) и в иммобилизованном состоянии (2) фотометрическим методом по гидролизу субстрата VAPNA (измерение оптической плотности проводили при 410 нм после 30 мин инкубации с субстратом при 30 °С; мембраны формировали из 2 мкл исходной смеси на поверхности керамических пластин; условия иммобилизации соответствуют кривой 5 на рис. 3, *a*; при определении активности в растворе в пробы вносили 2 мкл исходной смеси для формирования мембран). Каждая точка — результат усреднения трех измерений. Ошибка измерений не превышала 10 %.

го белка. Однако при времени инкубации в парах ГА меньше 40 мин адгезия мембран к поверхности была недостаточной (0,5—0,7 отн. ед). Добавление глицерина (оптимальной была определена концентрация 10 %, данные не приведены) позволило получить стабильные мембраны, выдерживающие до 100 измерений и показывающие стандартное отклонение величины сигнала не более 10 %. При увеличении концентрации суммарного белка в растворе для формирования мембраны с 4 до 8 % активность мембран, полученных при одинаковых условиях иммобилизации, возросла практически в 2 раза (рис. 3 *a*, кривые 2, 5). Добавление в исходную смесь 5 мМ CaCl_2 не оказывало существенного влияния на активность и стабильность мембраны. Этого следовало ожидать, так как известно, что ионы Ca^{2+} , как правило, не влияют на активность сериновых протеиназ, а лишь стабилизируют их в отношении автолитического расщепления [12], которое в данном случае сведено к минимуму из-за включения трипсина в комплекс с $\alpha_2\text{M}$.

Таким образом, установлен следующий оптимальный состав исходной смеси для формирования мембраны: 8 % суммарного белка при молярном соотношении трипсин: $\alpha_2\text{M}$ 2:1, 10 % глицерина в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,6. Оптимальное время инкубации в парах ГА при 19 °С — 40 мин. Линейная зависимость величины сигнала от концентрации субстрата ВАЕЕ наблюдалась в диапазоне 0,1—1,0 мМ (рис. 3, *a*, кривая 5).

Сравнительное изучение активности иммобилизованного при оптимальных условиях комплекса трипсин— $\alpha_2\text{M}$ и $\alpha_2\text{M}$ -связанного трипсина в растворе проводили фотометрическим методом по гидролизу субстрата VAPNA (см. «Материалы и методы»). Результаты измерений представлены на рис. 3, *б*. Показано, что в иммобилизованном состоянии комплекс сохраняет не менее 50 % исходной активности.

Важной характеристикой мембраны при создании биосенсора является ее стабильность при хранении. Показано, что при хранении сформированной мембраны в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,6, при 4 °С ее показатели (активность, адгезия к поверхности) оставались стабильными в течение 30 дней.

Полученные мембраны использовали для дальнейшего исследования возможности непрямого сенсорного определения свободных протеиназ. Для этого необходимо было выяснить, как указывалось выше, оптимальные условия работы иммобилизованного на поверхность рН-ПТ фермента. Известно, что активность иммобилизованного фермента, а

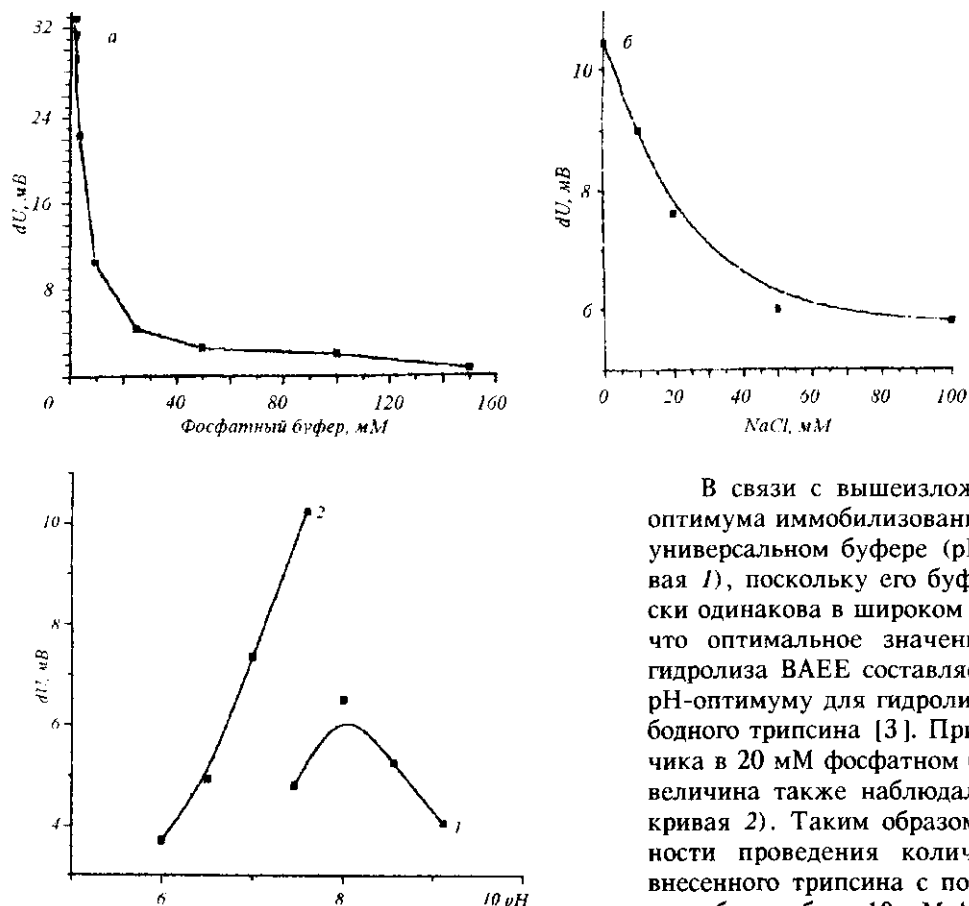


Рис. 5. Зависимость величины сигнала датчика на основе рН-ПТ и иммобилизованного комплекса трипсин— α 2М от рН рабочего буфера: 1 — универсального буфера (см. раздел «Материалы и методы»); 2 — 20 мМ фосфатного буфера

также величина измеряемого сигнала потенциометрического датчика на его основе существенно зависят от концентрации и ионной силы рабочего буфера [2, 8]. Это было подтверждено результатами измерений, представленными на рис. 4. Выявлено существенное снижение величины измеряемого сигнала датчика при увеличении концентрации и ионной силы буфера. Наиболее вероятно, что это вызвано изменением степени набухания мембран, приводящим к уменьшению их проницаемости. Стабилизацию величины измеряемого сигнала наблюдали при концентрации фосфатного буфера (рН 7,6) выше 20 мМ (рис. 4, а) и концентрации NaCl — выше 50 мМ в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,6) (рис. 4, б). Однако из-за существенного уменьшения величины сигнала в этих условиях измерения для дальнейших исследований выбрана концентрация буфера 10 мМ при отсутствии дополнительных солей.

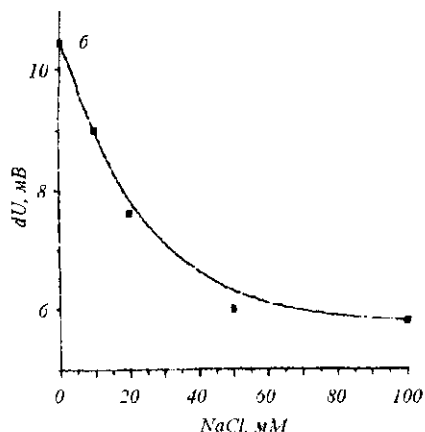


Рис. 4. Зависимость величины сигнала датчика на основе рН-ПТ и иммобилизованного комплекса трипсин— α 2М от состава рабочего буфера: а — от концентрации фосфатного буфера (рН 7,6); б — от концентрации добавленного NaCl в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,6). Измерения проводили при концентрации субстрата ВАЕЕ в пробе 1,5 мМ и температуре 25 °С

В связи с вышеизложенным определение рН-оптимума иммобилизованных мембран проводили в универсальном буфере (рН 6,0—9,0) (рис. 5, кривая 1), поскольку его буферная емкость практически одинакова в широком диапазоне рН. Показано, что оптимальное значение рН для определения гидролиза ВАЕЕ составляет 8,0. Это соответствует рН-оптимуму для гидролиза ВАЕЕ с участием свободного трипсина [3]. При измерении сигнала датчика в 20 мМ фосфатном буфере его максимальная величина также наблюдалась при рН 8,0 (рис. 5, кривая 2). Таким образом, для изучения возможности проведения количественных определений внесенного трипсина с помощью полученного датчика был выбран 10 мМ фосфатный буфер, рН 8,0, при отсутствии дополнительных солей. Концентрация субстрата ВАЕЕ в буфере, использованная для проведения таких измерений, была определена на линейном участке зависимости величины сигнала датчика от концентрации субстрата и составила 0,4 мМ.

Как указывалось выше, на рис. 1 представлен типичный отклик биосенсора на внесение трипсин-содержащего тест-раствора после получения исходного сигнала на фиксированную концентрацию ВАЕЕ. На рис. 6 приведены зависимости изменения величин сигнала датчика ($dU_0 - dU_t$) от активности внесенного трипсина, зафиксированные через 1 и 2 мин после его внесения. Установлено, что линейный участок калибровочной кривой для определения активности внесенного свободного трипсина находится в пределах активности 0,1—30 ед ВАЕЕ/мл. Увеличение времени инкубации датчика в растворе, содержащем свободный фермент, позволяет повысить чувствительность измерения при малых концентрациях фермента в исследуемом растворе (рис 6). Полученные результаты косвенно свидетельствуют в пользу сохранения основных свойств фермента в мембране, а также демонстри-

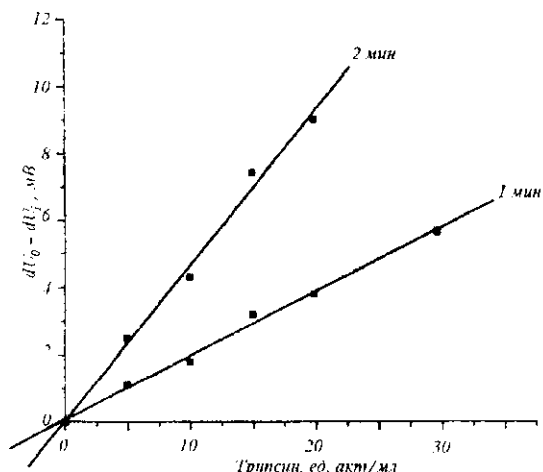


Рис. 6. Зависимости изменения величины сигнала датчика на основе рН-ПТ и иммобилизованного комплекса трипсин— α_2 М от концентрации раствора трипсина через 1 и 2 мин после его внесения. Измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере, рН 8,0, 25 °С. Раствор трипсина добавляли после получения сигнала датчика на 0,4 мМ ВАЕЕ. Каждая точка — результат усреднения трех измерений. Ошибка измерений не превышала 5 %

руют принципиальную возможность разработки биосенсора на ее основе для непрямого определения протеиназ в растворах.

O. A. Beloivan, A. P. Soldatkin

The α_2 -macroglobulin—trypsin complex as a sensitive element of a potentiometric biosensor for mediated quantitative determination of proteinases

Summary

A possibility of application of the α_2 -macroglobulin (α_2 М)—trypsin complex as a sensitive element of a potentiometric biosensor for mediated quantitative determination of proteinases through their esterase activity at the hydrolysis of Na-benzoyl-L-arginin-ethyl ester (BAEE) has been studied. The α_2 М—trypsin complex immobilization at pH-FET surface in saturated glutaraldehyde (GA) vapours has been optimized. The selective membrane characteristics have been studied. The optimal conditions of measuring BAEE hydrolysis by the biosensor obtained have been determined. A possibility to detect 0.1—1.0 mM BAEE and trypsin activity within the range of 0.1—30 U/ml has been shown. A conclusion has been made that the membrane developed is promising as a sensitive element of the potentiometric biosensors.

O. A. Білоіван, О. П. Солдаткін

Комплекс α_2 -макроглобулін—трипсин як чутливий елемент потенціометричного біосенсора для опосередкованого кількісного визначення протеїназ

Резюме

Вивчено можливість використання комплексу α_2 -макрогло-

булін (α_2 М)—трипсин як чутливого елемента потенціометричного біосенсора для опосередкованого кількісного визначення протеїназ за їхньою естеразною активністю при гідролізі Na-бензойл-L-аргінін етилового ефіру (ВАЕЕ). Оптимізовано умови іммобілізації комплексу α_2 М—трипсин на поверхню рН-чутливого польового транзистора в насичених парах глутарового альдегіду. Вивчено властивості розробленої мембрани. Знайдено оптимальні умови вимірювання гідролізу ВАЕЕ за допомогою одержаного на її основі датчика. Показано принципову можливість визначення концентрації ВАЕЕ в межах 0,1—1,0 мМ і трипсину — 0,1—30 ед. акт./мл. Зроблено висновок щодо перспективності використання розробленої мембрани як чутливого елемента потенціометричного біосенсора.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fu H., Anzai J., Osa T., Matsuo T. Proteolytic enzyme sensors using an ion-sensitive field effect transistor // Chem. Pharm. Bull.—1988.—36, N 3.—P. 1190—1193.
2. Белоиван О. А., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В. Протеолитический биосенсор на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. 2. Характеристика работы в модельных условиях // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 4.—С. 25—30.
3. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим Ф. И. Протеолиз в норме и при патологии.—Киев: Здоровье, 1998.—199 с.
4. Roberts R. C. Alpha-2-Macroglobulin // J. Med.—1985.—16, N 1—3.—P. 129—219.
5. Веремеенко К. М., Кизим О. Й., Досенко В. Є. α_2 -Макроглобулін: структура, фізіологічна роль і клінічне значення // Лаб. діагностика.—2000.—N 2.—С. 3—8.
6. Mirza M., Saleemuddin M. Entrapment of nonproteolytic enzymes in α_2 -macroglobulin using immobilized trypsin // Anal. Biochem.—1993.—213.—P. 133—139.
7. Osada T., Kuroda Y., Ikai A. Endocytotic internalization of α_2 -macroglobulin: α -galactosidase conjugate by cultured fibroblasts derived from Fabry hemizygote // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1987.—142.—P. 100—106.
8. Белоиван О. А., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В. Протеолитический биосенсор на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. Изучение сравнительных характеристик нативного и иммобилизованного трипсина для создания энзимобиосенсора // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 3.—С. 29—33.
9. Shulga A. A., Strikha V. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V. Removing the influence of buffer concentration on the response of enzyme field effect transistor by using additional membranes // Anal. chim. acta.—1993.—278.—P. 234—239.
10. Schwert G. W., Takenaka Y. Determination of trypsin and chymotrypsin // Biochim. et biophys. acta.—1955.—16.—P. 570—575.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
12. Антонов В. К. Химия протеолиза.—М.: Наука. 1991.—504 с.

УДК 543.554.2 + 577.152.34
Надійшла до редакції 11.04.02