

Влияние дополнительных положительно заряженных полимерных мембран на аналитические характеристики кондуктометрических глюкозных биосенсоров

В. Н. Архипова

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143. Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Проведено сравнение рабочих характеристик кондуктометрических глюкозных энзимосенсоров, модифицированных и не модифицированных дополнительной положительно заряженной полимерной мембраной. Использование такой дополнительной мембраны приводит к существенному расширению динамического диапазона работы сенсора и увеличению его чувствительности. Изучено влияние буферной емкости и ионной силы анализируемой среды на величины откликов обоих типов сенсоров. Также были исследованы операционная стабильность работы полученных биосенсоров и воспроизводимость их измерений.

Введение. Среди биосенсоров, разработанных на сегодняшний день, доминирующее положение занимают датчики для определения глюкозы, так как именно глюкоза является одним из главных метаболитов, который чаще всего определяется в биологических средах, а именно: при диагностике сахарного диабета [1]. У здоровых людей уровень глюкозы в крови составляет 3—5 мМ. Заболевание сахарным диабетом в большинстве случаев возникает в результате недостаточности инсулярного аппарата поджелудочной железы (β -клеток, продуцирующих инсулин), что сопровождается повышением уровня сахара в крови и наличием его в моче. Лечение больных диабетом в зависимости от тяжести заболевания назначают, основываясь на данных анализа уровня глюкозы в крови. Контроль должен осуществляться достаточно часто. Поэтому проблема создания биосенсора для точного, надежного и быстрого определения количества глюкозы в крови имеет большое значение в современной медицинской диагностике.

Широкое использование глюкозных биосенсоров на практике лимитировано рядом их недостат-

ков. В некоторых случаях — это недостаточно высокая чувствительность и стабильность сенсоров, но чаще — узкий линейный диапазон определяемых концентраций. Рабочие характеристики известных потенциометрических и кондуктометрических биосенсоров также очень сильно зависят от условий среды (ионной силы, буферной емкости и pH), что постоянно необходимо учитывать при проведении анализа [2].

Цель данной работы состояла в изучении действия положительно заряженных дополнительных мембран на основные аналитические характеристики кондуктометрического ферментного биосенсора — линейный динамический диапазон работы, чувствительность и влияние факторов среды на величину его отклика.

Материалы и методы. В работе использовали β -глюкозооксидазу (ГОД) из *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4, Косарский спиртзавод Черкасского производственного объединения спиртовой промышленности) с активностью 168 ед. акт/мг; бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ, Франция); 25 %-й раствор глютарового альдегида (ГА) фирмы «Serva» (ФРГ); глюкозу фирмы «Sigma» (США, Франция); poly(4-

vinylpyridine-co-styrene) (продукт № 19 207-4 фирмы «Aldrich Chem. Co», США) (PVCS).

Для приготовления буферного раствора использовали Tris фирмы «Reanal» (Венгрия). Другие реактивы были отечественного и импортного производства с квалификацией «ос. ч.» и «х. ч.».

Кондуктометрические преобразователи представляли собой подложку размером 30×5 мм, на которой размещены две пары одинаковых тонкопленочных гребенчатых электродов, полученных вакуумным напылением [3].

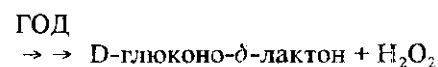
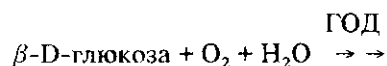
Для образования биоматрицы готовили раствор фермента и БСА в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, с конечными концентрациями 50 мг/мл и смешивали в соотношении 1:1 соответственно. В раствор смеси ГОД — БСА добавляли глицерин до конечной концентрации 10 % для стабилизации фермента при иммобилизации, предотвращения преждевременного высыхания раствора и улучшения адгезии мембраны к поверхности преобразователя.

На поверхность одной пары электродов наносили каплю смеси ГОД — БСА, на поверхность другой пары — 10 %-й раствор БСА в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащий 10 %-й глицерин (эта пара была датчиком сравнения). Для полимеризации мембран датчики помещали в атмосферу насыщенных паров ГА на 30 мин, а потом подсушивали на воздухе в течение 20—30 мин [4, 5].

Для формирования дополнительного заряженного полимерного слоя брали 1—2 мкл 0,5 %-го раствора PVCS в этаноле, наносили поверх ферментсодержащей и референтной мембран и подсушивали на воздухе.

Перед работой сенсоры вымачивали некоторое время в буферном растворе до получения стабильного сигнала. Измерения концентраций глюкозы проводили в модельных буферных растворах при комнатной температуре в открытом объеме при интенсивном перемешивании. Концентрацию глюкозы изменяли, добавляя определенные аликвоты концентрированного раствора. В работе использовали оригинальную кондуктометрическую установку, величины откликов сенсора измеряли в стационарном режиме [3].

Результаты и обсуждение. В основе работы кондуктометрического биосенсора для определения глюкозы лежит регистрация изменения проводимости в ферментсодержащей мембране за счет изменения концентрации протонов в результате диссоциации глюконовой кислоты, образующейся при окислении глюкозы с помощью ГОД по схеме:



I
глюконовая кислота

II
остаток глюконовой кислоты + H^+ .

На рис. 1 представлены калибровочные кривые для кондуктометрических глюкозных биосенсоров без дополнительной мембраны и с дополнительными PVCS-слоями различной толщины. Видно, что сенсор без дополнительной мембраны имеет узкий динамический диапазон работы (до 1,5 мМ глюкозы) (кривая 1). Причиной ограниченного динамического диапазона глюкозного сенсора является лимитирование биокаталитического окисления глюкозы недостатком кислорода в реакционной среде [6, 7]. При использовании дополнительной мембраны происходит некоторое ограничение диффузии глюкозы внутрь мембраны, в то время как небольшие молекулы кислорода могут свободно туда проникать. В результате происходит расширение динамического диапазона работы сенсора до 3—5 мМ глюкозы (кривые 2, 3). Дальнейшее увеличение толщины PVCS-мембраны (три слоя полимера) приводит к возрастанию динамического диапазона работы датчика до 10 мМ.

При использовании дополнительной мембраны также заметно расширяется амплитуда отклика.

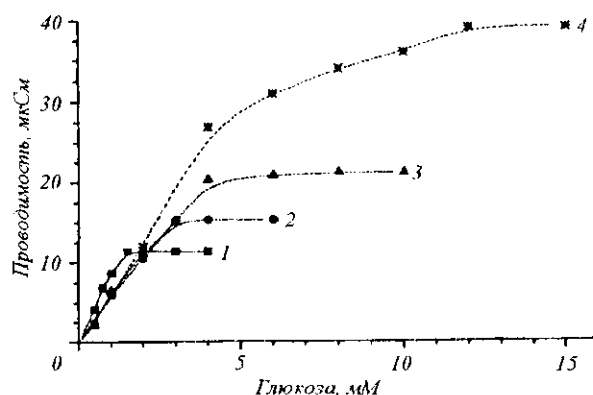


Рис. 1. Калибровочные кривые для кондуктометрического глюкозного биосенсора без дополнительной мембраны (1) и с дополнительными PVCS-мембранами различной толщины (один слой полимера (2), два слоя (3) и три слоя (4)). Измерения проводили в 5 мМ трисовом буфере, pH 7,4

Этот эффект можно объяснить тем, что за счет положительно заряженных функциональных групп внутри полимера создается диффузионный барьер для протонов, блокируя диффузию свободных протонов из мембраны.

При значительном увеличении толщины дополнительной мембраны происходит существенное возрастание времени отклика и уменьшение чувствительности сенсора, так как мембрана становится слишком плотной и сильно ограничивает диффузию обоих субстратов (кислорода и глюкозы).

На рис. 2 представлены калибровочные кривые для глюкозного биосенсора без дополнительной мембраны (а) и с PVCs дополнительной мембраной (б) в трисовом буфере различных концентраций. Перед измерениями для обеспечения одинаковой проводимости среды все буферные растворы были подтитрованы концентрированным раствором NaCl [5]. Из рис. 2 видно, что амплитуда отклика биосенсора как с дополнительной PVCs мембраной, так и без нее очень сильно зависит от концентрации буферного раствора (при изменении концентрации буфера с 1 до 10 мМ происходит уменьшение отклика биосенсора практически в 10 раз). Дальнейшее увеличение концентрации буфера до 20 мМ делает определение глюкозы практически невозможным, сенсор становится нечувствительным к добавлению субстрата. Зависимость амплитуды отклика от концентрации буфера можно объяснить связыванием протонов, образующихся внутри мембраны, с частицами буфера («облегченная» диффузия протонов) [8]. Таким образом, чем больше буферная емкость раствора, тем больше протонов связано с частицами буфера и соответственно тем меньше величина отклика.

Следующим этапом работы было изучение влияния ионной силы раствора на величину отклика глюкозного биосенсора (рис. 3). Известно, что чувствительность кондуктометрического преобразователя линейно зависит от фоновой проводимости среды [4], а вариация ионной силы образца не влияет на кинетику отклика сенсора [3]. В наших экспериментах время отклика биосенсора без дополнительной мембраны на добавление глюкозы оставалось неизменным при определениях в растворах с различной ионной силой, но при этом уменьшалась величина отклика (рис. 3, кривая 1). Это позволяет сделать вывод о том, что фоновая концентрация ионов не влияет на ферментативную кинетику и массоперенос протонов в мембране, но изменяет чувствительность самого преобразователя. Присутствие же дополнительной мембраны уменьшает действие соли на величину отклика биосенсора (рис. 3, кривая 2), вероятно, за счет ограничения ее диффузии. В этом случае при малых концентрациях NaCl происходит даже некоторое увеличение отклика за счет возможной стабилизации работы фермента при небольших концентрациях соли [7].

Сравнение операционной стабильности и воспроизводимости работы сенсора (с дополнительной мембраной и без нее) показало, что сенсор, модифицированный PVCs слоями, демонстрирует улучшение этих характеристик. Так, разброс величин откликов на добавление 1 мМ глюкозы для обычного датчика составляет около 10 %. В случае же кондуктометрического глюкозного биосенсора с дополнительной мембраной разброс величин уменьшается до 5 % и значительно увеличивается его операционная стабильность.

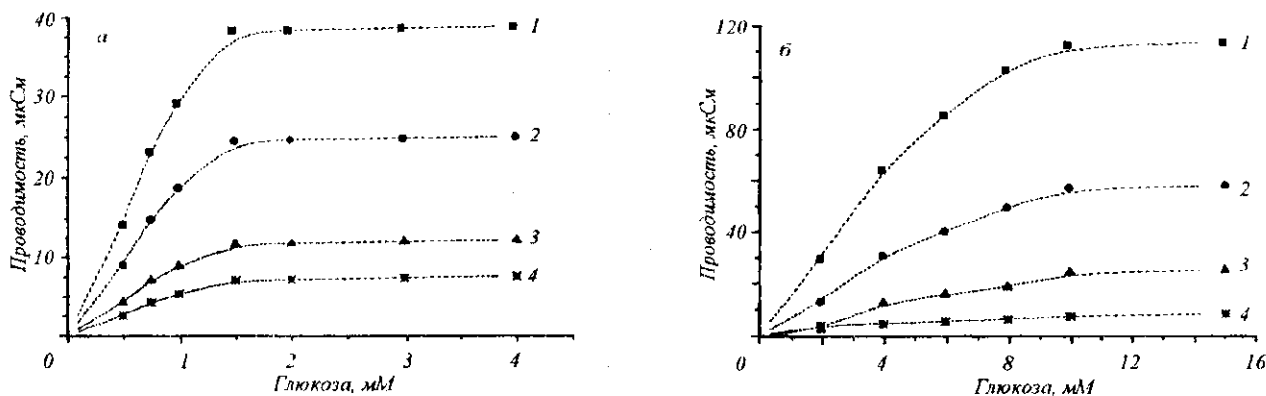


Рис. 2. Калибровочные кривые для кондуктометрического глюкозного биосенсора без дополнительной мембраны (а) и с дополнительной положительно заряженной полимерной мембраной (б). Измерения проводили в 1 (1), 2 (2), 5 (3) и 10 мМ (4) трисовом буфере, рН 7,4

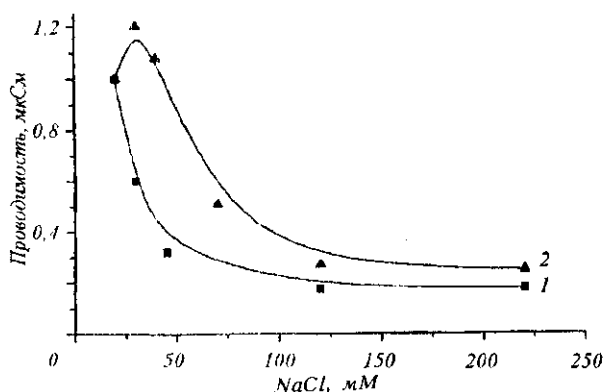


Рис. 3. Зависимость величины отклика кондуктометрического глюкозного биосенсора (без дополнительной мембраны (1) и с дополнительной PVCS-мембраной (2)) от концентрации NaCl в 5 мМ триэтовом буфере, pH 7,4. Концентрация глюкозы в растворе 1 мМ

Таким образом, использование дополнительных положительно заряженных мембран приводит к существенному расширению динамического диапазона работы сенсора, увеличению его чувствительности и операционной стабильности, а также воспроизводимости результатов измерений.

Часть этой работы выполнена благодаря финансовой поддержке Министерства по делам науки и технологий (проект № 5.4/74 Государственного фонда фундаментальных исследований).

В. М. Архипова

Вплив додаткових позитивно заряджених полімерних мембран на аналітичні характеристики кондуктометричних глюкозних біосенсорів

Резюме

У роботі порівняно робочі характеристики кондуктометричних глюкозних ензимосенсорів, модифікованих та не модифікованих додатковою позитивно зарядженою полімерною мембраною. Використання такої додаткової мембрани призводить до значного розширення динамічного діапазону роботи сенсора та підвищення його чутливості. Вивчено вплив буферної ємності та іонної сили на величину відгуку сенсорів з додатковою мембраною та без неї. Також досліджено опе-

раційну стабільність роботи отриманих біосенсорів та відтворюваність їхніх вимірів.

Valentina N. Arkhipova

Influence of additional positively charged polymer membranes on the analytical characteristics of conductometric glucose biosensors

Summary

The working characteristics of conductometric glucose enzyme-based sensors with and without additional positively charged polymer membrane have been compared. The use of this additional membrane resulted in substantial extension of the sensor dynamic range and increasing of its sensitivity. The influence of buffer capacity and ionic strength on the biosensor response was examined for the sensors with and without additional membrane. Also operational stability of created sensors and reproducibility of measurements were studied.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmid R. D., Karube I. Biosensors and «Bioelectronics // Biotechnology / Eds H.-J. Rehm, G. Reed.—Weinheim: VCH, 1988.—V. 6b.—P. 317—365.
- Biosensors: Fundamentals and Applications / Eds A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson.—Oxford: Univ. press, 1987.—770 p.
- Shul'ga A. A., Soldatkin A. P., El'skaya A. V. et al. Thin-film conductometric biosensor for glucose and urea determination // Biosensors and Bioelectronics.—1994.—9.—P. 217—223.
- Дзядевич С. В., Корпан Я. И., Солдаткин А. П. и др. Использование кондуктометрических микросенсоров для определения кинетических параметров ферментов // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 5.—С. 47—54.
- Shul'ga A. A., Dzyadevich S. V., Soldatkin A. P. et al. Conductometric biosensors for glucose and urea based on microfabricated thin-film interdigitated array-electrodes // Bi-ol. Ital.—1993.—23, N 6.—P. 40—45.
- Hanazato Y., Nakako M., Maeda M., Shiono S. Glucose sensor based on a field-effect transistor with a photolithographically patterned glucose oxidase membrane // Anal. chim. acta.—1987.—193.—P. 87—96.
- Солдаткин А. П., Сандровский А. К., Шулъга А. А. и др. Глюкозный биосенсор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. Зависимость отклика биосенсора от состава анализируемого раствора // Журн. аналит. химии.—1990.—45, № 7.—С. 1405—1409.
- Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A. et al. Glucose sensitive conductometric biosensor with additional NAFION membrane: reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range // Anal. chim. acta.—1984.—288.—P. 197—203.

Поступила в редакцию 22.10.97