

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.2.205823>

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ КОНСТРУКЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ГЛУТАМАТОКСИДАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЛУТАМАТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

Д. О. Мруга^{1,2}, Д. Ю. Кучеренко¹, Т. О. Борисова³, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, 01601, м. Київ, Україна

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ КОНСТРУКЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ГЛУТАМАТОКСИДАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЛУТАМАТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

Д. О. Мруга, Д. Ю. Кучеренко, Т. О. Борисова, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін

Анотація. В даній роботі оптимізовано амперометричний глутамат-чутливий біосенсор. Як перетворювач було використано платиновий дисковий електрод. Біоселективний елемент біосенсора створений на основі ферменту глутаматоксидази, ковалентно зв'язаної з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою глутарового альдегіду. Було оптимізовано умови іммобілізації ферменту на поверхні перетворювача (концентрації ферменту і глутарового альдегіду та час іммобілізації). Для перевірки можливості функціонування даного біосенсора в складних біологічних речовинах було досліджено вплив температури та наявності білку в зразку, що аналізується, на роботу біосенсора. Також в роботі було перевірено селективність розробленого біосенсора відносно можливих інтерферуючих речовин. Лінійний діапазон біосенсора лежав в межах від 5 до 600 мкМ глутамату, а чутливість становила 150-200 нА/мМ. Мінімальна границя визначення складала 2 мкМ глутамату. Отримані дані свідчать про можливість та перспективність застосування розробленого біосенсора для визначення вмісту глутамату в зразках сироватки крові.

Ключові слова: амперометричний метод, біосенсор, іммобілізований фермент, глутаматоксидаза, концентрація глутамату

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF CONSTRUCTION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE GLUTAMATE OXIDASE FOR DETECTION OF GLUTAMATE IN THE SERUM SAMPLES

D. O. Mruga, D. Yu. Kucherenko, T. O. Borisova, S. V. Dzyadevych, O. O. Soldatkin

Abstract. In this study, an amperometric glutamate-sensitive biosensor has been optimized. The platinum disk electrode was used as a transducer. The enzyme glutamate oxidase that is covalent crosslinked with bovine serum albumin by glutaraldehyde was used as a bioselective element. Conditions of enzyme immobilization on the transducer surface were optimized (enzyme and glutaraldehyde concentrations and immobilization time). To test the possibility of this biosensor functioning in complex biological samples, the influence of the working solution parameters on the biosensor operation was investigated (concentration of the working buffer solutions, its temperature, presence of the protein in the analyzed sample). In addition, the selectivity of the developed biosensor with regarding to possible interference was tested. Linear range of biosensor was obtained in the range of 5 to 600 μM of glutamate and the sensitivity was 150-200 nA/mM. The minimum limit of detection was 2 μM glutamate. The obtained data indicate the possibility of application of developed biosensor for determination of content of glutamate in the serum samples.

Keywords: amperometric method, biosensor, immobilized enzyme, glutamate oxidase, glutamate concentration

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ КОНСТРУКЦИИ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ГЛЮТАМАТОКСИДАЗЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛЮТАМАТА В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Д. А. Мруга, Д. Ю. Кучеренко, Т. А. Борисова, С. В. Дзядевич, А. А. Солдаткин

Аннотация. В данной работе оптимизирован амперометрический глютамат-чувствительный биосенсор. В качестве преобразователя был использован платиновый дисковый электрод. Биоселективный элемент биосенсора разработанный на основе глютаматоксидазы, ковалентно связанной с бычьим сывороточным альбумином с помощью глутарового альдегида. Оптимизированы условия иммобилизации фермента на поверхности преобразователя (концентрации фермента и глутарового альдегида, время иммобилизации). Для проверки возможности функционирования данного биосенсора в сложных биологических образцах исследовали влияние температуры и наличия белка в анализируемом образце на работу биосенсора. Также в работе проверена селективность разработанного биосенсора относительно возможных интерферирующих веществ. Линейный диапазон биосенсора лежал в пределах от 5 до 600 мкМ глютамата, а чувствительность составляла 150-200 нА/мМ. Минимальная граница определения составляла 2 мкМ глютамата. Полученные данные свидетельствуют о возможности и перспективности применения разработанного биосенсора для определения содержания глютамата в образцах сыворотки крови.

Ключевые слова: амперометрический метод, биосенсор, иммобилизованный фермент, глютаматоксидаза, концентрация глютамата

Вступ

Глутамат або глутамінова кислота є найбільш поширена амінокислота в організмі – вона складає близько третини всіх циркулюючих в крові амінокислот. Глутамат займає важливе місце в біохімічних шляхах та фізіологічних процесах людини та інших тварин. Крім ролі джерела синтезу замісних амінокислот і будівельного матеріалу для білків, він також виконує регуляторну функцію: присутність глутамату підвищує вміст Na^+ в серці, скелетних м'язах та нирках, K^+ в серці, нирках і печінці, знижуючи його вміст в плазмі [1], а глутаматні рецептори стимулюють вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму [2].

Також глутамат бере участь у підтриманні гомеостазу міжклітинного аміаку (як амінокислотний човен, що транспортує аміак через мембрани [3]) та загалом в азотному обміні в організмі, зокрема, глутамат відіграє суттєву роль в знешкодженні токсичного аміаку, надлишок якого спостерігається при гіпоксії, гіпероксії та аміачному отруєнні.

Проте, найбільш впливовою функцією глутамату є його медіаторна роль, адже глутамат – найпоширеніший нейротрансмітер [4], що активує іонотропні та метаболічні глутаматні рецептори, та безпосередній попередник інгібуючого нейромедіатора γ -аміномасляної кислоти. З іншого боку, надмірна кількість глутамату може викликати пошкодження нейронів, пов'язані з такими захворюваннями, як аміотрофічний бічний склероз, латиризм та хвороби Альцгеймера та Паркінсона [5]. Крім того, високий рівень глутамату в крові та інших біологічних рідинах свідчить про наявність ішемічного інсульту, епілепсії чи інших неврологічних розладів [6], він слугує маркером діабетичної ретинопатії та раку підшлункової залози, а також може бути засобом діагностування раннього аутизму. Саме тому необхідно розробити пристрій для моніторингу рівня глутамату в плазмі крові.

Концентрацію глутамату в крові можна визначити такими методами як вискоефективна рідинна хроматографія [7], газова хроматографія [8,9,10,11], капілярний електрофорез [12], потенціометричне титрування [13], флуориметрія [14], спектрофотометрія [15] та хемілюмі-

несценція [16] і, навіть, радіочастотний сигнал [17]. Всі ці методи дуже чутливі та точні, однак потребують складного та дорогого обладнання [18,19], кваліфікованого персоналу, трудомісткої пробопідготовки зразка, більше того, вони непридатні для швидкого вимірювання [20] чи аналізу великої кількості зразків, що критично в клінічній біохімії. Зрозуміло, що на сьогодні є актуальним створення мобільного, точного, швидкого, селективного та дешевого способу вимірювання вмісту глутамату в біологічних зразках.

Саме тому останнім часом активно розвиваються фізико-біологічні методи моніторингу, зокрема біосенсори. На сьогодні існує низка розроблених біосенсорів. Серед них є як оптичні, так і електрохімічні біосенсори для визначення глутамату. В основі їх роботи лежать ферментативні реакції за участі глутаматоксидази [21,22], глутаматдегідрогенази [23,24], глутаматсинтетази та глутаматдекарбоксілази [25,26,27], а іммобілізація ферментів проводилася на Ni-Pd наночастинках [28], оптично-волоконному датчику [29], твердотільному електроді на основі непластифікованого хітозана [30], золотому електроді, що був модифікований поліаніліном та наночастинками поліпропілену [31], та товстоплівковому платиновому електроді [32].

Метою даної роботи була розробка оптимальної конструкції амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази для визначення концентрації глутамату в сироватці крові та підбір найкращих умов його експлуатації.

Матеріали і методи

Матеріали

Для створення біосенсора було використано фермент - рекомбінантна глутаматоксидаза (ГЛОД), отримана з *Streptomyces sp.* з активністю 7 од. акт. мг^{-1} (Yamasa Corporation, Японія). Бичачий сироватковий альбумін (фракція V)(BCA), 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), гліцерин, NEPES, метафенілендіамін було отримано від фірми Sigma-Aldrich (США). Як субстрат було використано L-глутамат натрію (Sigma-Aldrich, США). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, зокрема пероксид водню, етиловий

спирт були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

Конструкція амперометричного перетворювача

Як фізичний перетворювач використовувався платиновий дисковий електрод, схема якого приведена на рис. 1. Для виготовлення такого електроду платиновий дріт запаювали в скляний капіляр та легкоплавким сплавом Вуда з'єднували його з внутрішнім провідником. Зріз платинового дроту, що контактує з оточуючим середовищем є робочою зоною. Епоксидною смолою герметизувався протилежний від робочої зони кінець скляної трубки та приєднувалася контактна площа для підключення електроду до вимірювальної системи. Робочу зону перед першим використанням та періодично в подальшому використанні механічно обробляли за допомогою шліфувального паперу та пасти з порошку оксиду алюмінію різного діаметру (0,3 та 0,05 мкм). Очищення робочої поверхні спиртовим розчином здійснювалося перед кожним нанесенням біоселективного елементу.

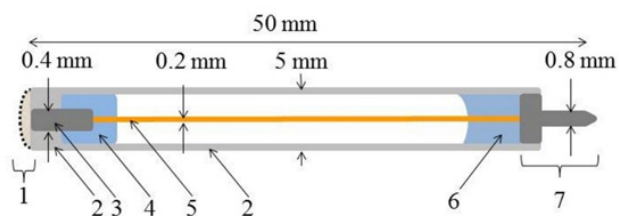


Рис. 1. Схематичне зображення амперометричного електроду на основі платинового дроту діаметром 0,4 мм: 1 – біоселективний елемент; 2 – скляний корпус електроду; 3 – платиновий дріт; 4 – електричне з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 5 – внутрішній провідник; 6 – епоксидна смола; 7 – контактна площа стандартного типу

Методика нанесення поліфенілендіамінової мембрани

При вимірюванні концентрації глутамату в зразках сироватки крові необхідно підвищити селективність біосенсору, оскільки на ньому може окиснюватися не лише субстрат, а й інші молекули, що містяться в крові, наприклад, аскорбінова кислота. Висока селективність амперометричних перетворювачів до перекису

водню в присутності електроактивних речовин досягається шляхом електрохімічного нанесення на чисту поверхню платинового дроту напівпроникної мембрани на основі полі-*мета*-фенілендіаміну, яка утворює пори, достатні за розміром для проходження пероксиду водню до поверхні перетворювача, і які затримують молекули більшого діаметру. Для формування цієї мембрани відшліфований та очищений за допомогою спирту електрод занурюють в захищену від світла комірку з 5 мМ розчином *мета*-фенілендіаміну та полімеризують методом циклічної вольтаметрії (рис. 2). Робиться 10-20 циклів, допоки вольтамперограми майже не будуть відрізнятися одна від одної, що свідчить про повне покриття поверхні електрода шаром полі-*мета*-фенілендіаміна.

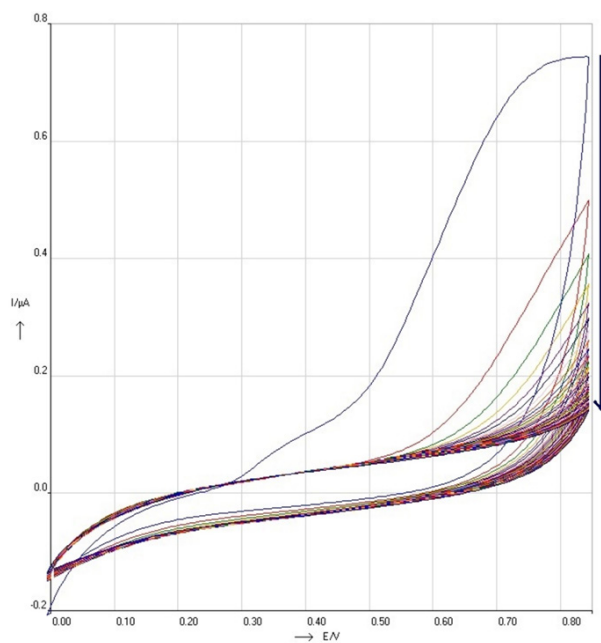


Рис. 2. Циклічні вольтамперограми, отримані при формуванні ПФД-мембрани на платиновому дисковому електроді, впродовж 30 циклів. Потенціал змінювався в межах від 0 до 850 мВ

Методика нанесення біоселективного елементу

Для створення чутливого до глутамату біоселективного елементу біосенсору взяли за основу метод ковалентної іммобілізації фермента на поверхні електроду за допомогою глутарового альдегіда (ГА). Готувався гель, що містив 8% (масова частка) ГЛОД, 4% БСА та

10% гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Гліцерин був необхідний для стабілізації ферменту і покращення адгезії мембрани. Наступним кроком цей гель змішувався з водним розчином ГА (0,1%) в співвідношенні 1:4. Отриману суміш одразу наносили на чутливу зону електроду і висушували на повітрі за кімнатної температури протягом 35 хвилин. Готовий біосенсор відмивали від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буфері (HEPES) протягом 10 хвилин.

Схема установки для амперометричних вимірювань

В ході експерименту використовувалася триелектродна схема амперометричного аналізу (схематичне зображення приведено на рис. 3). Робочі біосенсиори, допоміжний платиновий електрод (що має значно більшу робочу поверхню і необхідний для замкнення ланцюга, тобто повернення електронів до розчину під дією напруги, що спричиняє на ньому процес відновлення, за величиною еквівалентний процесу окиснення на робочому електроді) та хлор-срібний (Ag/AgCl) електрод порівняння (необхідний для коректного вимірювання поданого потенціалу) підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). До потенціостата також підключався пристрій (8-канальний PalmSens multiplexer),

що дозволяв отримувати сигнали з декількох робочих електродів одночасно). Відстань між всіма електродами була однаковою і складала близько 5 мм.

Методика вимірювання

Вимірювання проводилися за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 2,5 мл, при постійному перемішуванні та постійному потенціалі (який був попередньо підібраний експериментальним шляхом) +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, що відповідає потенціалу окиснення пероксиду водню H_2O_2 на аноді.

Робочим буфером слугував 25 мМ HEPES з рН 7,4, а концентрація субстрату в комірці задавалась додаванням аліквоти концентрованого розчину. Усі дослідження проводились декілька раз, а дані, наведені в роботі, є середнім значенням. Всі розрахунки проводились в програмі OriginLab PrigonPro 8.5.

Результати та обговорення

Принцип роботи біосенсора

В основі роботи біосенсора лежить ферментативна реакція (1), що протікає в біоселективній мембрані, в результаті якої окиснюється глутамат та утворюється електрохімічно-активний пероксид водню.

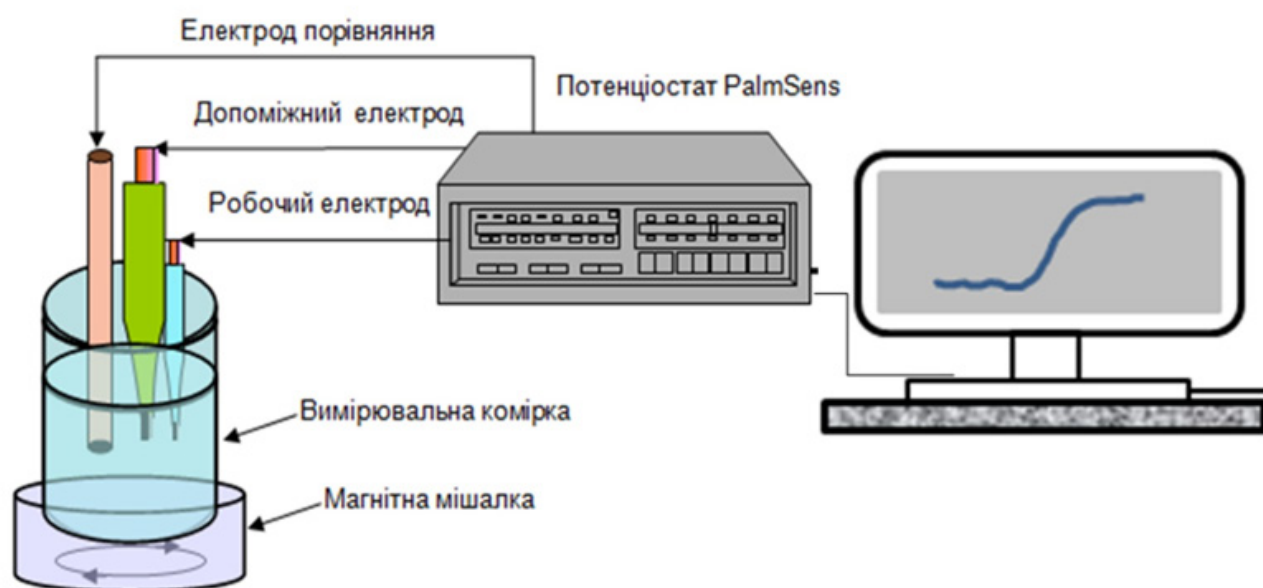
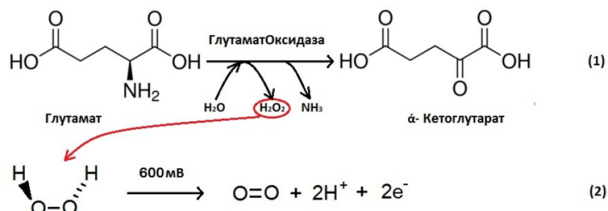


Рис. 3. Схема експериментальної установки для амперометричних вимірювань

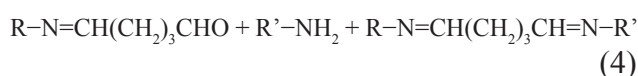
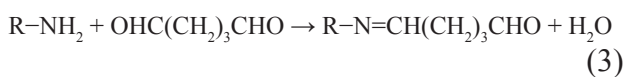
Якщо до електроду прикласти потенціал в 600 мВ відбувається анодне розкладання пероксиду водню (2), з утворенням електронів, які реєструє амперометричний перетворювач.



Оптимізація складу ферментної мембрани

Аналітичні характеристики біосенсора сильно залежать від складу біоселективної мембрани. Цей параметр суттєво впливає на чутливість, лінійний діапазон роботи, селективність та стабільність біосенсора, саме тому необхідно підібрати оптимальне співвідношення компонентів в біоселективній мембрані. В даній роботі іммобілізацію ферменту на робочій поверхні амперометричного перетворювача проводили шляхом ковалентної зшивки між собою ГЛОД та БСА за допомогою ГА. Ферментна суміш (8% ГЛОД) та водний розчин ГА (0,1%) наносили на робочу поверхню перетворювача у різних співвідношеннях. В результаті було отримано низку варіантів біосенсорів, калібрувальні криві яких наведено на рис. 4.

Такий великий розкид величин відгуку біосенсора в стані ферментативного насичення субстратом (від 50 нА до 270 нА) можна пояснити ступенем взаємодії компонентів робочого гелю з ГА: формується основа Шиффа (сполука з подвійним зв'язком між С та N, де азот зв'язаний з арильною або алкільною групою)(3), яка в свою чергу здатна реагувати з аміногрупами також з утворенням основи Шиффа (4).



Зрозуміло, що при недостатній кількості зшиваючого агенту більша частина фермента

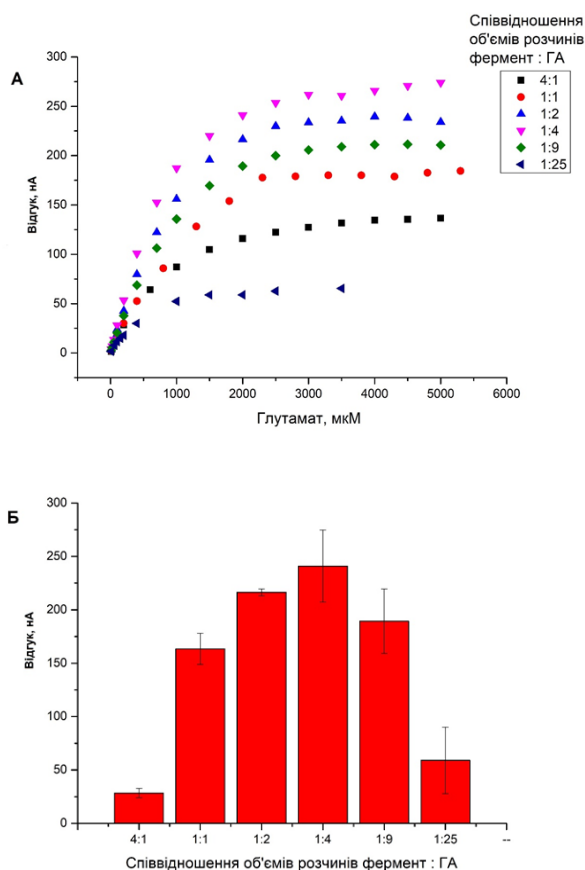


Рис. 4. Калібрувальні криві для визначення глутамата (А) та графік залежності величини відгуку від співвідношення об'ємів розчинів ферменту та ГА (концентрація глутамату – 2000 мкМ). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

не іммобілізується, і його незв'язані молекули вимиваються з біоселективної мембрани при роботі біосенсора. А при надлишку ГА під час іммобілізації утворюється більше ніж необхідно поперечних зшивок, що призводить до необоротних змін в структурі ГЛОД, які негативно впливають на роботу ферменту. Експериментальні дані підтверджують прогнозований характер зміни активності іммобілізованого ферменту, відповідно, чутливості біосенсору до глутамату (рис. 4). При аналізі отриманих даних було визначено оптимальне співвідношення розчинів ферменту і ГА – 1:4.

Також було перевірено роботу біосенсора в залежності від концентрації ГА в стоковому розчині. Результати вимірювань показали, що

найбільшу чутливість біосенсор проявляє при іммобілізації фермента з використанням 0,05% та 0.1% ГА (рис. 5). Більш високі концентрації зшиваючого агенту призводили до надлишкової іммобілізації ферменту, а менш концентрований ГА не закріплював фермент достатньо щільно, в наслідок чого він вимивався з біоселективної мембрани впродовж роботи.

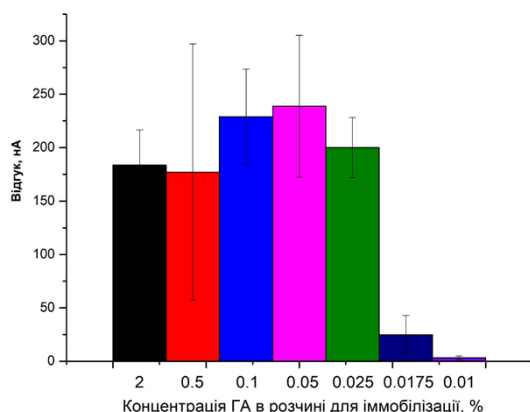


Рис. 5. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації ГА в розчині для іммобілізації. Концентрація глутамату – 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Визначення оптимальної тривалості іммобілізації

Ще одним важливим параметром при створенні біосенсора є тривалість іммобілізації. Вона суттєво впливає на якість біоселективної мембрани, адже за недостатній час ковалентні зшивки не встигнуть утворитися, а за надлишкового часу хімічна активність ГА призведе до незворотних змін в конформаційній структурі ГлОД, що негативно позначиться на роботі біосенсора. Тому вибір тривалості іммобілізації проводився на основі аналізу даних, з урахуванням величини відгуку та відтворюваності біосенсора. Оптимальна тривалість становила 35 хвилин (рис. 6).

Аналіз ефективності іммобілізації ферменту

Згідно з ферментативною реакцією, що протікає в біоселективній мембрані глута-

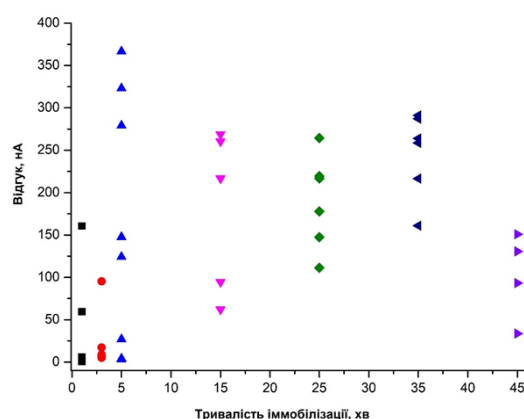


Рис. 6. Залежність величини відгуку біосенсора від тривалості іммобілізації ферменту. Концентрація глутамату – 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

мат-чутливого біосенсора, при перетворенні однієї молекули субстрату утворюється одна молекула пероксиду водню. Відповідно, при ідеальних умовах іммобілізації ферменту та виготовлення біоселективного елементу біосенсора відгуки на додавання однакових концентрацій субстрату (глутамату) та пероксиду водню повинні бути майже однаковими. Звісно досягнути рівних відгуків на перексид водню та глутамат в реальних умовах не можливо, але по різниці відгуків можливо було аналізувати успішність іммобілізації.

Тому, для перевірки ефективності процедури іммобілізації ферменту необхідно було порівняти величини відгуків біосенсора на однакову концентрацію пероксиду водню та глутамату. Було показано, що розроблений біосенсор мав лише вдвічі меншу чутливість до глутамату, порівняно з чутливістю до пероксиду водню (рис. 7), що, враховуючи обмеження в дифузії, є достатньо гарним результатом і свідчить про успішну іммобілізацію ферменту.

Вплив присутності білкових молекул в розчині на ефективність роботи біосенсора

Майже в усіх біологічних рідинах часто присутня висока концентрація білку. На жаль, ці молекули можуть фізично забивати біоселективну мембрану біосенсора, погіршивши

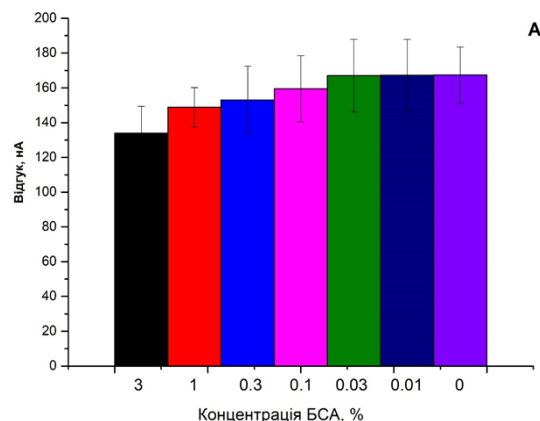
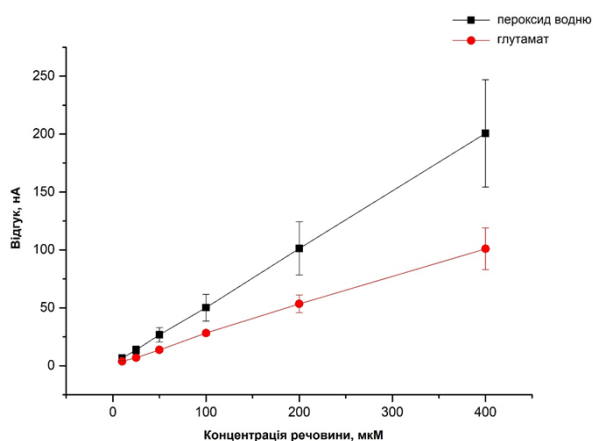


Рис. 7. Калібрувальні графіки біосенсора на пероксид водню (1) та глутамат (2). Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

її проникні властивості. В результаті цього дифузія субстрату до активного центру ферменту ускладнюється і величина відгуку біосенсора падає. Результати дослідження впливу даного параметру на функціонування біосенсора продемонстровано на рис. 8А. Присутність в розчині сироваткового альбуміну у нормальних для біологічних рідин концентраціях (з урахуванням розведення зразка) мала деякий вплив на чутливість біосенсора до глутамату (падіння відгуку на 12-18% при наявності в розчині 3% БСА) (рис 8Б). При вимірюванні концентрації глутамату в реальних зразках нівелювати цей вплив можна за рахунок більшого розведення.

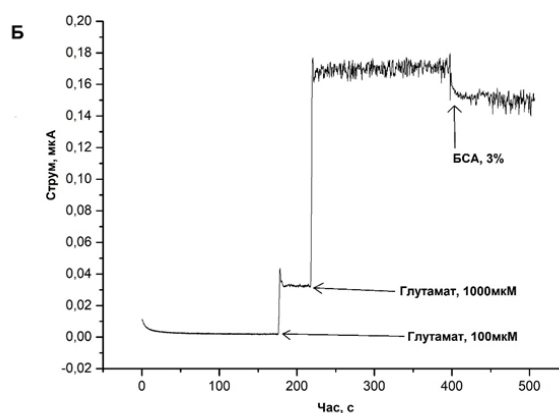


Рис. 8. Залежність величини відгуку біосенсора від присутності білка в робочій комірці (А) та падіння сигналу при внесенні білка (3%) в робочий буферний розчин під час вимірювання (Б). Концентрація глутамату – 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Вплив температури на роботу біосенсора

Відомо, що температура середовища впливає на швидкість утворення фермент-субстратного комплексу і, відповідно, швидкість протікання ферментативної реакції. Відповідно, було необхідно дослідити вплив температури робочого розчину на функціонування біосенсора. Було показано, що біосенсор на основі глутаматоксидази дуже чутливий до змін цієї характеристики середовища (рис 9А). Спочатку, за підвищення температури від кімнатної до 45°C збільшується величина відгуку біосенсора на 80%, а при подальшому зростанні температури до 80°C відбувається теплова де-

натурація білкової частини фермента, аж до її повного руйнування.

Для того, щоб довести, що дана залежність (рис 9А) зумовлена саме впливом температури на біоселективний елемент біосенсора, а не на фізичний перетворювач, необхідно було дослідити, як впливає температура на функціонування голого платиногового електрода (рис. 9.Б). З рисунку 9.Б видно, що при збільшенні температури від 25°C до 80°C сигнал амперометричного сенсора рівномірно зростає, в той час як відгук біосенсора на субстрат спочатку зростає (до 45°C), а потім падає (з 45°C до

80°C), що свідчить про суттєвий вплив температури саме на ферментну мембрану.

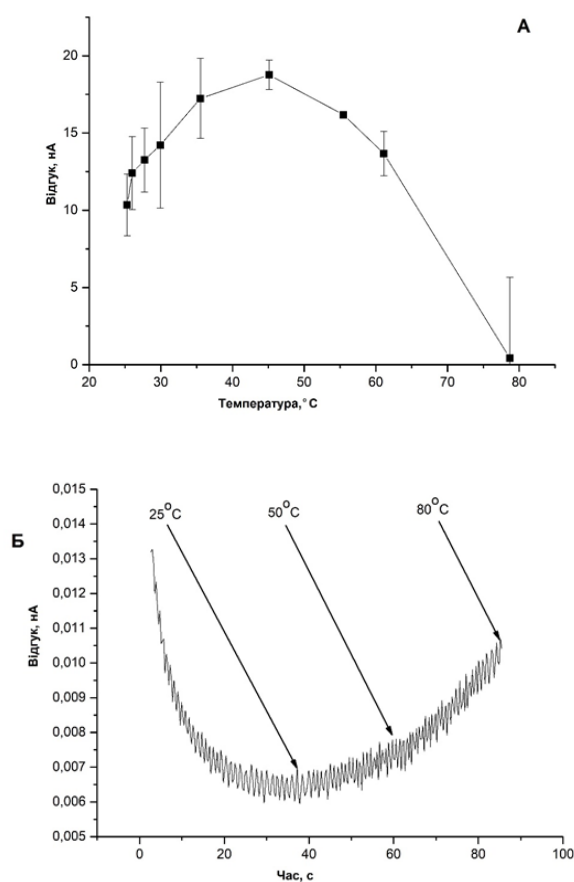


Рис. 9. Залежність величини відгуку біосенсора від температури робочого розчину (А) та зміна сигналу амперометричного перетворювача при підвищенні температури (Б). Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Вивчення селективності біосенсора

Глутамат-чутливий біосенсор призначений для визначення глутамату в зразках сироватки крові. Крім глутамату в даних зразках можуть бути присутні такі електроактивні речовини, що самостійно окиснюються при прикладенні потенціалу і можуть давати хибний позитивний відгук (аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота та ін.). Їх вплив ми нівелювали використанням ПФД мембрани. Ефективність даного методу можна оцінити з графіків

(рис.10). Неселективні відгуки на аскорбінову кислоту та цистеїн зменшились на порядок і стали несуттєвими величинами порівняно з відгуком на перексид водню.

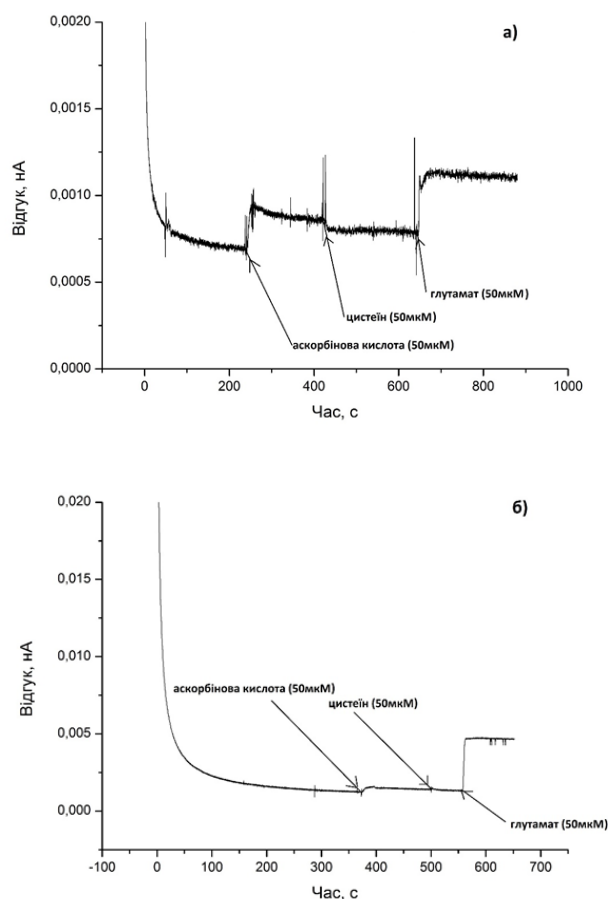


Рис. 10. Відгуки амперометричного перетворювача на додавання електроактивних речовин до (а) та після (б) нанесення ПФД мембрани. Концентрація перекису водню складала 100 мкМ, аскорбінової кислоти – 50 мкМ, цистеїну – 50 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Селективність будь-якого біосенсора залежить як від селективності перетворювача (що була покращена використанням додаткової ПФД-мембрани), так і від селективності біоселективного елементу. Відповідно, було перевірено селективність біосенсора відносно різних амінокислот (рис. 11). Виявлено невисоку чутливість до аспарагіну, глутаміну, аспарагінової кислоти та гістидину, що була

меншою в 50-100 разів, за чутливість біосенсора до глутамату. Відповідно присутність цих амінокислот в зразку не призводить до суттєвого відхилення у вимірюваннях, а інші амінокислоти не спричиняли відгуку біосенсора. Чутливість до деяких амінокислот можна пояснити неідеальною селективністю ГлОД до глутамату, а також наявністю у препараті ГлОД слідових кількостей інших ферментів (наприклад, оксидази L-амінокислот).

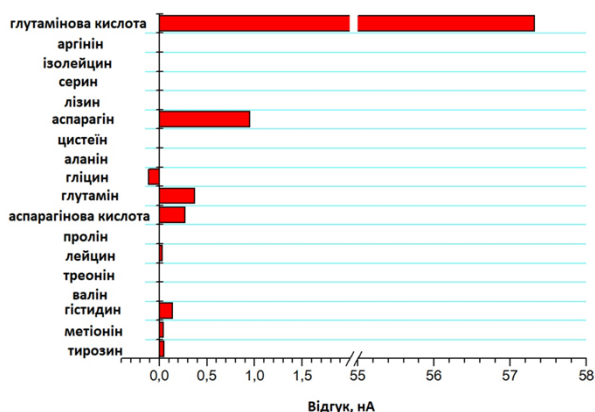


Рис. 11. Відгуки біосенсора на додавання різних амінокислот. Концентрації амінокислот – 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Крім того, з літературних даних, відомо, що біологічні рідини можуть містити інші інтерференти, що можуть впливати на селективність біосенсора. Подальші дослідження показали, що сечовина, ЕДТА, глюкоза, лимонна кислота, бензойна кислота, азид натрію, α -кетоглутарат, NaCl, KCl та CaCl₂ не призводили до відгуків біосенсора при концентрації даних речовин у робочій комірці 1 мМ.

Аналітичні характеристики оптимізованого біосенсора

Останнім етапом розробки кожного біосенсора є дослідження його аналітичних характеристик. Відповідно, при дослідженні аналітичних характеристик розробленого біосенсора було встановлено, що, за умови оптимізації конструкції та параметрів роботи біосенсора, при використанні 25 мМ НЕРЕС

буферу, рН 7,4, мінімальна межа визначення глутамату становила 2 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора та зростала в процесі використання. Калібрувальний графік біосенсора для визначення глутамату наведено на рис. 12. Лінійний діапазон роботи біосенсора був від 5 до 600 мкМ, чутливість до глутамату становила 150-200 нА/мМ, а час відгуку – 5-20 с. (в залежності від концентрації глутамату).

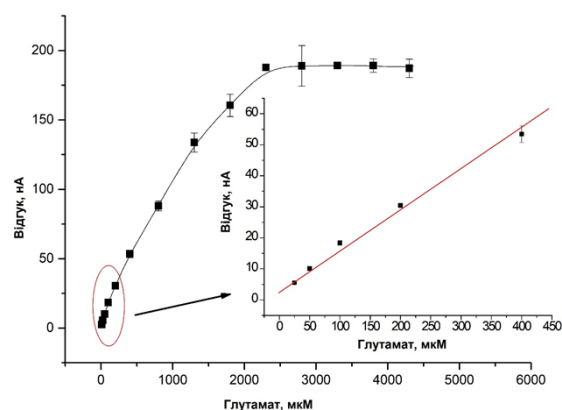


Рис. 12. Калібрувальний графік глутамат-чутливого біосенсора. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Отримані аналітичні характеристики розробленого біосенсора свідчать про перспективність застосування даного біосенсора при аналізі концентрації глутамату в зразках сироватки крові.

Висновки

В роботі було розроблено амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі іммобілізованої ГлОД та платинового дискового електрода, створено його лабораторний прототип, оптимізовано роботу та досліджено робочі характеристики.

В ході роботи було підібрано оптимальні умови іммобілізації ферменту на поверхні перетворювача: найбільш стабільні та високі відгуки біосенсора досягалися при змішуванні 1 об'єму розчину ГлОД (8%) та 4 об'ємів розчину ГА (0,05-0,1%) та тривалості іммобілізації на повітрі протягом 35 хвилин.

При підборі оптимальних умов експлуатації розробленого біосенсора було отримано залежність величини відгуків біосенсора від температури робочого буферного розчину. Також було показано, що розроблений біосенсор може працювати в біологічних зразках, що містять білкові компоненти, хоча і спостерігається деякий спад величини відгуку (10-12% при наявності 3% БСА в розчині).

Було проаналізовано селективність запропонованого в роботі біосенсора. Перевіряли, як селективність амперометричного перетворювача відносно електроактивних речовин, так і селективність біоселективного елементу відносно різних компонентів біологічних рідин. Дослідження аналітичних характеристик глутамат-чутливого біосенсора виявило, що його лінійний діапазон роботи становив від 5 до 600 мкМ субстрату, а чутливість – 150-200 нА/мМ при часі відгуку 5-20 с. Мінімальна границя визначення складала 2 мкМ глутамату.

Таким чином, розроблений біосенсор характеризувався гарними аналітичними характеристиками і є перспективним для вимірювання концентрації глутамату в реальних зразках сироватки крові.

Подяка

Робота була проведена завдяки фінансовій підтримці від НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України ««Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

Список використаної літератури

[1]. Han M, Kopeck W, Solov'yov Ia et al. Glutamate Water Gates in the Ion Binding Pocket of Na⁺ Bound Na⁺, K⁺-ATPase // J. Sci. Rep, 7 (2017).

[2]. Mark P Mattson. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease // Ann New York Acad Sci, 1144(1), pp 97-112 (2009).

[3]. Lasse K Bak, Arne Shousboe, Helle S Waagepetersen. The glutamate/GABA- glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // J. Neurochem, 98(3), pp 641-653 (2016).

[4]. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // J. Nutr, 130, pp 1007-1015 (2000).

[5]. Batra B, Pundir C S. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode // Biosens Bioelectron, 47, pp 496-501 (2013).

[6]. A Aliprandi, M Longoni, L Stanzani et al. Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake // J. Cerebr. Blood Flow Metabol, 25, pp 513-519 (2005).

[7]. P R Beljaars, R. van Dijk, E. Bisschop, M. Spiegelenberg. Liquid chromatographic determination of free glutamic acid in soup, meat product, and Chinese food: interlaboratory study // J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Int, 79, pp 697-702 (1996).

[8]. Christine A Farthing, Don E Farthing, Ronald E Gress et al. Determination of L-Glutamic Acid and γ -Aminobutyric Acid in Mouse Brain Tissue Utilizing GC-MS/MS // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 1068-1069, pp 64-70 (2017).

[9]. R W Kondrat, K Kanamori, B D Ross, In vivo microdialysis and gas chromatography/mass spectrometry for ¹³C-enrichment measurement of extracellular glutamate in rat brain // J. Neurosci. Methods, 120, pp 179-192 (2002).

[10]. Richard W Kondrat, Keiko Kanamori, Brian D Ross In vivo microdialysis and gas chromatography/mass spectrometry for ¹³C-enrichment measurement of extracellular glutamate in rat brain // J Neurosci Methods, 120 (2), pp 179-92 (2002).

[11]. Shin HJ, Park NH, Lee W et al. Metabolic profiling of tyrosine, tryptophan, and glutamate in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry combined with single SPE cleanup // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 1051, pp 97-107 (2017).

[12]. W H Church, CS Lee, K M Dranchak, Capillary electrophoresis of glutamate and aspartate in rat brain dialysate. Improvements in detection and analysis time using cyclodextrins // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., 700, pp 67-75 (1997).

[13]. Gündüz T, Gündüz N, Kiliç E et

al. Titrations in non-aqueous media. Part X. Potentiometric and conductimetric titrations of amino acids with tetrabutylammonium hydroxide in pyridine and acetonitrile solvents // *Analyst*, 113, pp 715–719 (1988).

[14]. Innocenti B, Parpura V, Haydon P G. Imaging Extracellular Waves of Glutamate during Calcium Signaling in Cultured Astrocytes // *J. Neurosci*, 20(5), pp 1800–1808 (200).

[15]. Carolina C Acebal, Adriana G Lista, Beatriz Fernandez-Band. Simultaneous determination of flavor enhancers in stock cube samples by using spectrophotometric data and multivariate calibration // *J Food Chem*, 106(2) pp 811-815 (2008).

[16]. Murachi T, Tabata M Use of a bioreactor consisting of sequentially aligned L-glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase for the determination of ammonia by chemiluminescence // *Biotechnol Appl Biochem*, 9 (4), pp 303-309 (1987).

[17]. An L, Li S, Murdoch JB, Araneta MF et al. Detection of glutamate, glutamine, and glutathione by radiofrequency suppression and echo time optimization at 7 tesla // *Magn Reson Med*, 73 (2), pp 451-458 (2015).

[18]. Defaix C, Solgadi, A, Pham, T H et al. Rapid Analysis of Glutamate, Glutamine and GABA in Mice Frontal Cortex Microdialysis Samples Using HPLC Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal*, 152, pp 31–38 (2018).

[19]. Fontana A C K. Protocols for Measuring Glutamate Uptake: Dose-Response and Kinetic Assays in In Vitro and Ex Vivo Systems // *Curr. Protoc. Pharmacol*, 82 (1), p 45 (2018).

[20]. Campos C D M, deCampos Braga P A, Reyes F G Ret al. F. Elimination of the Artefact Peaks in Capillary Electrophoresis Determination of Glutamate by Using Organic Solvents in Sample Preparation // *J. Sep. Sci*, 38(21), pp 3781–3787 (2015).

[21]. Hitoshi Kusakabe, Yuichiro Midorikawa et al. Methods for Determining L-Glutamate in Soy Sauce with L-Glutamate Oxidase. (1984).

[22]. Villarta RL, Cunningham DD, Guilbault GG Amperometric enzyme electrodes for the determination of l-glutamate // *Talanta*, 38(1), pp 49-55 (1991).

[23]. Hughes G, Pemberton RM, Fielen PR et al. Screen-Printed Amperometric Biosensor for the Determination of Glutamate in Food and Clinical Applications // *Methods Mol Biol*, 1572, pp 1-12 (2017).

[24]. Hughes G, Pemberton RM, Fielen PR et al. A novel reagentless glutamate microband biosensor for real-time cell toxicity monitoring // *Anal Chim Acta*, b933, pp 82-88 (2016).

[25]. Zhiming Liu, Tsutomu Horiuchi, Osamu Niwa et al. NADH and glutamate on-line sensors using Os-gel-HRP/GC electrodes modified with NADH oxidase and glutamate dehydrogenase. (1999).

[26]. Ling D, Wu G, Wang C et al. The preparation and characterization of an immobilized l-glutamic decarboxylase and its application for determination of l-glutamic acid // *Enzyme Microb Technol*, 27(7), pp 516-521 (2000).

[27]. Shi R, Stein K Flow. Injection Methods for Determination of L-Glutamate Using Glutamate Decarboxylase and Glutamate Dehydrogenase Reactors With Spectrophotometric Detection // *Analyst*, 9 (1996).

[28]. Yu H, Ma Z, Wu Z. Immobilization of Ni-Pd/core-shell nanoparticles through thermal polymerization of acrylamide on glassy carbon electrode for highly stable and sensitive glutamate detection // *Anal Chim Acta*, 896, pp 137-142 (2015).

[29]. Bernd AA, Dremel, Rolf D Schmid. Comparison of two fibre-optic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon dioxide, and their application in combination with flow-injection analysis to the determination of glutamate // *Anal Chim Acta*, 248(2), pp 351-359 (1991).

[30]. Iiiyas md isa, Sulaiman Ab Ghani A non-plasticized chitosan based solid state electrode for flow injection analysis of glutamate in food samples // *Food Chem*, 112(3), pp 756-759 (2009)

[31]. Brahma Barta, Seema Kumari, Chandra Shekar Pundir. Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrole nanoparticles/polyaniline modified gold electrode // *Enz Microb Tech*, 57, pp 69-77 (2014).

[32]. Kwong AWK, Grundig B, Hu J et al. Comparative study of hydrogel-immobilized L-

glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples // *Biotech Lett*, 22, pp 267-272 (2000).

Стаття надійшла до редакції 20.04.2020 р.

UDC 543.06:577.15:543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.2.205823>

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF CONSTRUCTION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE GLUTAMATE OXIDASE FOR DETECTION OF GLUTAMATE IN THE SERUM SAMPLES

D. O. Mruga^{1,2}, D. Yu. Kucherenko¹, T. O. Borisova³, S. V. Dzyadevych^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,
150 Zabolotnogo str., 03680, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University,
64 Volodymyrska str., 01003, Kyiv, Ukraine

³Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine,
9 Leontovicha str., 01601, Kyiv, Ukraine

Summary

Glutamate or glutamic acid is the most common amino acid in the body - it constitutes about a third of all circulating amino acids in the blood. Glutamate plays an important part in the biochemical pathways and physiological processes of humans and other animals. In addition to its role as a source of synthesis of essential amino acids and a building material for proteins, it also performs regulatory functions in the body.

High levels of glutamate in the blood and other body fluids indicate the presence of ischemic stroke, epilepsy or other neurological disorders, it serves as a marker of diabetic retinopathy and pancreatic cancer, and can be a means of diagnostics of early autism. That is why there is a need to develop new devices for monitoring the concentration of glutamate in serum.

Today a new biotechnological direction, the development of biosensors, is very actively developing. Accordingly, it is important to create a mobile, accurate, fast, selective biosensor for measuring the content of glutamate in biological samples.

The aim of this work was to develop the optimal design of an amperometric biosensor based on glutamate oxidase for determination of concentrations of glutamate in the serum and select the best conditions for its operation.

Research methods: The amperometric method of analysis was used in the work. Platinum disk electrodes were used as amperometric transducers. The working electrodes, the auxiliary platinum electrode and the Ag/AgCl reference electrode were connected to the PalmSens potentiostat according to the three-electrode amperometric measurement scheme. The 8-channel multiplex connected to the potentiostat and allowed to receive signals simultaneously from several working amperometric electrodes. Immobilization of glutamate oxidase on the sensitive surface of the amperometric transducer was performed using the method of covalent crosslinking of the enzyme with BSA in a solution of glutaraldehyde.

The results of the study: In the course of the work the optimal conditions of enzyme immobilization on the surface of the transducer were selected: the most stable and high biosensor responses were achieved by mixing 1 volume of glutamate oxidase solution (8%) and 4 volumes of glutaraldehyde solution (0.05-0.1%). and the duration of immobilization in air for 35 minutes.

When selecting the optimal operating conditions of the developed biosensor, the dependence of the magnitude of the biosensor responses on the temperature of the working buffer solution was obtained. It was also shown that the developed biosensor can work in biological samples containing protein components, although there is some decrease in the magnitude of the response (10-12% in the presence of 3% BSA in solution).

The selectivity of the proposed biosensor was analyzed. Both the selectivity of the amperometric transducer with respect to electroactive substances and the selectivity of the bioselective element with respect to the various components of biological fluids were tested.

A study of the analytical characteristics of the glutamate-sensitive biosensor revealed that its linear operating range was from 5 to 600 μM of substrate, and the sensitivity was 150-200 nA/mM at a response time of 5-20 s. The minimum limit of determination was 2 μM glutamate.

Conclusions: The design and optimization of the amperometric glutamate-sensitive biosensor based on immobilized glutamate oxidase were developed and optimized, its laboratory prototype was created, the operating conditions were adapted and the operating characteristics were investigated. It is shown that the developed biosensor based on glutamate oxidase was characterized by high analytical characteristics and is promising for measuring the concentration of glutamate in real serum samples.

Keywords: amperometric method, biosensor, immobilized enzyme, glutamate oxidase, glutamate concentration

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.2.205823>

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ КОНСТРУКЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ГЛУТАМАТОКСИДАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЛУТАМАТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

Д. О. Мруга^{1,2}, Д. Ю. Кучеренко¹, Т. О. Борисова³, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, 01601, м. Київ, Україна

Реферат

Глутамат або глутамінова кислота є найбільш поширеною амінокислотою в організмі – вона складає близько третини всіх циркулюючих в крові амінокислот. Глутамат займає важливе місце в біохімічних шляхах та фізіологічних процесах людини та інших тварин. Крім ролі

джерела синтезу замінних амінокислот і будівельного матеріалу для білків, він також виконує регуляторні функції в організмі.

Високий рівень глутамату в крові та інших біологічних рідинах свідчить про наявність ішемічного інсульту, епілепсії чи інших неврологічних розладів, він є маркером діабетичної ретинопатії та раку підшлункової залози, а також може бути засобом діагностування раннього аутизму. Саме тому існує потреба в розробці нових пристроїв для моніторингу концентрації глутамату в плазмі крові.

На сьогодні дуже активно розвивається новий біотехнологічний напрямок – розробка біосенсорів. Відповідно є актуальним створення мобільного, точного, швидкого, селективного біосенсора для вимірювання вмісту глутамату в біологічних зразках

Мета даної роботи полягала в розробці оптимальної конструкції амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази для визначення концентрації глутамату в сироватці крові та підбір найкращих умов його експлуатації.

Методи дослідження: В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди. Робочі електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння за триелектродною схемою амперометричних вимірювань під'єднували до потенціостату PalmSens. 8-ми каналний мультиплексор під'єднувався до потенціостату та дозволяв отримувати сигнали одночасно з кількох робочих амперометричних електродів. Імобілізацію глутаматоксидази на чутливу поверхню амперометричного перетворювача проводили за допомогою методики ковалентного зшивання ферменту з БСА в розчині глутарового альдегіду.

Результати дослідження: В ході роботи було підібрано оптимальні умови імобілізації ферменту на поверхні перетворювача: найбільш стабільні та високі відгуки біосенсора досягалися при змішуванні 1 об'єму розчину ГлОД (8%) та 4 об'ємів розчину ГА (0,05-0.1%) та тривалості імобілізації на повітрі протягом 35 хвилин.

При підборі оптимальних умов експлуатації розробленого біосенсора було отримано залежність величини відгуків біосенсора від температури робочого буферного розчину. Також було показано, що розроблений біосенсор може працювати в біологічних зразках, що містять білкові компоненти, хоча і спостерігається деякий спад величини відгуку (10-12% при наявності 3% БСА в розчині).

Було проаналізовано селективність запропонованого біосенсора. Перевірено як селективність амперометричного перетворювача відносно електроактивних речовин, так і селективність біоселективного елемента відносно різних компонентів біологічних рідин.

Дослідження аналітичних характеристик глутамат-чутливого біосенсора виявило, що його лінійний діапазон роботи становив від 5 до 600 мкМ субстрату, а чутливість – 150-200 нА/мМ при часі відгуку 5-20 с. Мінімальна границя визначення складала 2 мкМ глутамату.

Висновки: В роботі розроблено та оптимізовано конструкцію амперометричного глутамат-чутливого біосенсора на основі імобілізованої ГлОД, створено його лабораторний прототип, адаптовано умови функціонування та досліджено його робочі характеристики. Показано, що розроблений біосенсор на основі ГлОД характеризувався високими аналітичними характеристиками і є перспективним для вимірювання концентрації глутамату в реальних зразках сироватки крові.

Ключові слова: амперометричний метод, біосенсор, імобілізований фермент, глутаматоксидаза, концентрація глутамату