

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2021.1.227408>

ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ

*О. О. Солдаткін^{1,4}, О. В. Солдаткіна², В. М. Архипова¹, І. І. Пилипонський¹, Л. С. Резніченко²,
Т. Г. Грузіна², С. М. Дибкова², С. В. Дзядевич^{1,3}, О. П. Солдаткін^{1,3}*

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного 150, Київ, 03143, Україна.

²Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України,
бульвар Академіка Вернадського, 42, Київ, 03142, Україна

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01003, Україна,

⁴Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського", пр-т Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

e-mail: alex_sold@yahoo.com, olgasoldatkina@yahoo.com, lrieznichenko@gmail.com,
gruzinatamara@gmail.com, sdybkova@gmail.com, dzyad@yahoo.com, a_soldatkin@yahoo.com

ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ

*О. О. Солдаткін, О. В. Солдаткіна, В. М. Архипова, І. І. Пилипонський, Л. С. Резніченко,
Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін*

Анотація. В роботі перевірено можливість використання наночастинок золота (НЧЗ) для модернізації біоселективних елементів біосенсорів з метою покращення їхніх аналітичних характеристик. В якості дослідної моделі було використано біоселективні елементи біосенсорів на основі ацетилхолінестерази, бутирилхолінестерази та глюкозооксидази. Іммобілізацію ферментів на поверхнях електрохімічних перетворювачів проводили за рахунок поперечної зшивки молекул відповідних ферментів та бичачого сироваткового альбуміну глутаровим альдегідом. В роботі оптимізували умови іммобілізації ацетилхолінестерази з наночастинка-

© О. О. Солдаткін, О. В. Солдаткіна, В. М. Архипова, І. І. Пилипонський,
Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін, 2021

ми золота. Для цього, підбирали оптимальну концентрацію зшиваючого агенту (глутарового альдегіду), тривалість іммобілізації, співвідношення ферменту та НЧЗ, концентрацію та розмір НЧЗ. Досліджено робочі характеристики біосенсорів на основі ферментів і НЧЗ та порівняно їх з характеристиками біосенсорів на основі лише ферментів. Також досліджувався вплив на стабільність біосенсорів при додаванні НЧЗ до біоселективного елементу біосенсорів, а саме відтворюваність безперервної роботи біосенсорів, відтворюваність приготування біосенсорів та їхня стабільність при зберіганні.

Показано, що використання НЧЗ в складі біоселективних елементів може покращити деякі характеристики біосенсорів, що може бути перспективним для їхнього подальшого застосування в біосенсориці.

Ключові слова: біосенсор, фермент, наночастинки золота, ацетилхолінестераза, бутерил-холінестераза, глюкозооксидаза, кондуктометрия, біоселективні елементи.

APPLICATION OF GOLD NANOPARTICLES FOR IMPROVEMENT OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF CONDUCTOMETRIC ENZYME BIOSENSORS

O. O. Soldatkin, O. V. Soldatkina, V. M. Arkhypova, I. I. Piliponskiy, L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. M. Dybkova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin

Abstract. In this work, the possibility of application of gold nanoparticles for modification of bioselective elements of conductometric biosensors to improve their analytical characteristics has been tested. A bioselective elements of biosensors based on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and glucose oxidase have been studied as a model of such system. Immobilization of enzymes on the surface of conductometric transducers was carried out by covalent crosslinking of enzymes by using a crosslinking agent (glutaraldehyde). The conditions for immobilization of acetylcholinesterase with gold nanoparticles in BSA membranes were optimized. The optimal concentration of glutaraldehyde, time of immobilization process, ratio of an amount of enzyme and gold nanoparticles, and the concentration and size of gold nanoparticles were selected. The improved characteristics of the developed biosensors based on enzymes and gold nanoparticles were investigated and compared with the characteristics of biosensors based only on enzymes without nanoparticles addition. It was shown, how the addition of gold nanoparticles to the bioselective element of the biosensor affects the stability of biosensors. In particular, the reproducibility of signals during continuous operation of biosensors, the reproducibility of the manufacture of biosensors and their stability during storage were investigated.

Thus, it was shown, that the application of gold nanoparticles in the composition of bioselective elements can improve some characteristics of biosensors, which may be promising for further biosensor application.

Keywords: conductometric biosensor, enzyme, gold nanoparticles, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glucose oxidase, bioselective elements.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОСЕНСОРОВ

*А. А. Солдаткин, О. В. Солдаткина, В. Н. Архипова, И. И. Пилипонский, Л. С. Резниченко,
Т. Г. Грузина, С. Н. Дыбкова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин*

Аннотация. В работе проверена возможность использования наночастиц золота для модификации биоселективных элементов кондуктометрических биосенсоров для улучшения их аналитических характеристик. В качестве модели исследовались биоселективные элементы биосенсоров на основе ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и глюкозооксидазы. Имобилизацию ферментов на поверхности кондуктометрических преобразователей проводили ковалентной сшивкой молекул ферментов с БСА с помощью сшивающего агента (глутарового альдегида). В работе оптимизировали условия имобилизации ацетилхолинэстеразы с наночастицами золота. Для этого подбирали оптимальную концентрацию глутарового альдегида, длительность процесса имобилизации, соотношение количества фермента и наночастиц золота, концентрацию и размер наночастиц золота. Исследовали рабочие характеристики разработанных биосенсоров на основе ферментов и наночастиц золота и сравнивали их с характеристиками биосенсоров на основе только ферментов без использования наночастиц. Изучали влияние на стабильность биосенсоров добавления наночастиц золота в биоселективный элемент биосенсора. В частности, проверяли воспроизводимость сигналов при непрерывной работе биосенсоров, воспроизводимость изготовления биосенсоров и их стабильность при хранении.

Показано, что использование наночастиц золота в составе биоселективных элементов может улучшить некоторые характеристики биосенсоров, что может быть перспективным для дальнейшего изучения и применения.

Ключевые слова: кондуктометрический биосенсор, фермент, наночастицы золота, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, глюкозооксидаза, биоселективный элемент.

ВСТУП

Розробка нових методів діагностування захворювань людини та сільськогосподарських тварин є надзвичайно актуальним завданням біотехнології. Одним із перспективних підходів є використання нових аналітичних приладів – біосенсорів, технології створення яких об'єднують в собі передові досягнення в галузі біології, фізики, хімії, математики, мікроелектроніки тощо. Одним із варіантів вдосконалення біосенсорних методів діагностики є використання наноматеріалів в складі цих приладів. Останнім часом біосумісні наноматеріали на основі благородних металів, полімерів та вуглецю все більше включаються в склад біосенсорів. При цьому різні наноструктури використовують для підвищення відповідного

аналітичного параметра біосенсора: ефективності роботи, стабільності, чутливості або селективності визначення.

Наночастинки золота (НЧЗ) можуть широко використовуватись в біосенсорах на основі ферментів. НЧЗ є високопровідними та біосумісними, можуть утворювати міцні тілові зв'язки між органічними речовинами (наприклад, залишками цистеїну ферментів) [1]. Таким чином, наночастинки утворюють відповідне мікросередовище для іммобілізації ферменту. Крім того, активність іммобілізованого ферменту може бути збережена шляхом іммобілізації на НЧЗ [2].

На даний момент, в світі вже відомо про розробку низки біосенсорів з використанням НЧЗ [3-5]. Наприклад, дослідники розробили біосенсор для аналізу форменатату (фосфорор-

ганічний пестицид). Для цього використали фермент лакказу, іммобілізовану на золотому електроді, що був попередньо модифікований електрохімічно нанесеними НЧЗ [6]. Аналіз базувався на інгібуванні лактазної активності пестицидом. Біосенсор був успішно застосований для детекції форменатату в плодах. Інший кондуктометричний біосенсор був розроблений для визначення пероксиду водню на основі пероксидази хрону, іммобілізованої в плівці хітозану з НЧЗ діаметром 10 нм [7]. Цікаво, що додавання наночастинок призвело до зменшення чутливості біосенсора, яке було пояснене авторами за рахунок різниці в окислювальних станах НЧЗ та активного центру пероксидази хрону. Відомо також про розробку потенціометричного біосенсора для визначення пестициду гліфосату [8]. Біосенсор був створений на основі уреазу, іммобілізованої з НЧЗ (Ø2,5 нм). Гліфосат інгібував уреазу, що детектувалось за рахунок зменшення сигналу амоній-чутливого електрода. Інший біосенсор розроблявся для визначення активності протейнінази А, він базувався на пероксидазі хрону, антитілах (IgG) та НЧЗ [9]. Використання наночастинок дозволяло зменшити робочий потенціал до 0,08 В.

Зміна діаметру НЧЗ внаслідок їх агрегації, а саме зростання розміру під час синтезу, призводить до зміни оптичних властивостей їхньої суспензії (змінюється адсорбція світла, що супроводжується зміною кольору). Це явище було використано для розробки біосенсора для колориметричного визначення інгібіторів ацетилхолінестерази [10]. За відсутності інгібіторів фермент каталізував розщеплення ацетилтіохоліну до оцтової кислоти та тіохоліну. Тіохолін зменшував концентрацію $AuCl_4^-$, що призводило до збільшення діаметра НЧЗ та зміни кольору суспензії від слаборожевого до фіолетового. У присутності інгібіторів ацетилхолінестерази, у зразку не спостерігалось ні зростання агрегації НЧЗ, ні відповідної зміни кольору розчину.

Зважаючи на позитивний вплив присутності НЧЗ на аналітичні характеристики біосенсорів, було сформульовано мету даної роботи, а саме дослідити вплив наночастинок золота з

розмірами 30 нм та 20 нм на робочі аналітичні характеристики кондуктометричних біосенсорів на основі АцХЕ, БуХЕ та ГОД. Проведення комплексних досліджень щодо розроблення та модифікації біоселективних елементів біосенсорів наночастинами золота дасть відповідь, чи може дана технологія впливати на аналітичні характеристики ферментних біосенсорів для визначення важливих метаболітів.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

В роботі використовували такі ферменти та реактиви: глюкозооксидаза (ГОД) з *Aspergillus niger* (ЕС 1.1.3.4) активністю 272 од.акт./мг (Genzyme, UK); ацетилхолінестераза (АцХЕ) із електричного вугря (ЕС 3.1.1.7) активністю 426 од.акт./мг; бутирилхолінестераза (БуХЕ) із сироватки крові коня (ЕС 3.1.1.8.) активністю 13 од.акт./мг; бичачий сироватковий альбумін (фракція V); 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА); бутирилхолінхлорид, ацетилхолінхлорид фірми „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина). Наночастинок золота, використані в роботі, синтезували за методом Туркевич-Френса [11-12] у власній модифікації шляхом відновлення золотохлористоводневої кислоти ($\geq 99.9\%$ trace metals basis, Sigma-Aldrich) цитратом натрію у присутності карбонату калію.

Сполуки для приготування буферів та інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.” та „ч.д.а.”.

2.2. Характеризація наночастинок золота

Морфологію синтезованих наночастинок золота визначали методами трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1400 (Jeol, Японія), центр колективного користування НАН України при Інституті мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України) та лазерно-кореляційної спектрометрії (Zetasizer-3, “Malvern Instruments Ltd”). Згідно отриманих даних наночастинок мали сферичну форму і середній розмір відповідно 20 і 30 нм (рис. 1).

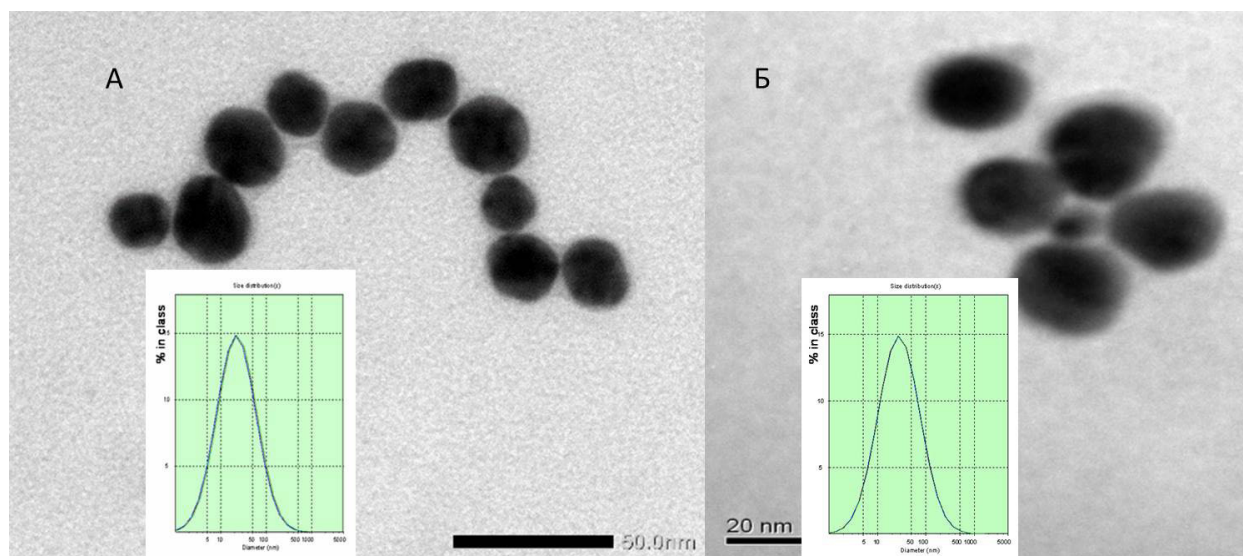


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні зображення і розподіл за гідродинамічним діаметром наночастинок золота розміром 20 нм (А) та 30 нм (Б)

2.3. Коїмобілізація ферментів з наночастинками золота в БСА мембрані з використанням розчину глутарового альдегіду

Для виготовлення біоселективних елементів біосенсорів шляхом коїмобілізації наночастинок золота і ферментів, була використана методика іммобілізації в розчині ГА (шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню кондуктометричного перетворювача). Базовий ферментний розчин містив 5% (тут і далі – масова частка) ацетилхолінестерази (або 10% бутирилхолінестерази чи глюкозооксидази), 5 % БСА у 100 мМ фосфатному буфері, рН 7,0.

Для формування біоселективних елементів з використанням наноматеріалів, колоїдний розчин наночастинок золота ($\varnothing 20$ нм та $\varnothing 30$ нм) (концентрація 38,6 мкг/мл) змішували з ферментними розчинами у різних співвідношеннях, а саме 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5. Потім для формування мембран на поверхні перетворювача, отриману суміш наночастинок з ферментом змішували 1:1 з водним розчином ГА (0,2-1%).

Перед нанесенням ферментних мембран, чутливі ділянки кондуктометричного перетворювача обробляли спиртом за допомогою ватного тампона. Далі їх промивали дистильова-

ною водою, та знову насухо протирали ватним тампоном. Одразу після цього суміш ферменту, наночастинок золота та ГА наносили на робочі поверхні перетворювачів та висувували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури. Нанесення мембран відбувалося за допомогою мікродозатора “Eppendorf” 0,1-2,5 мкл. Приблизний об’єм суміші, який необхідно нанести на поверхню перетворювача для формування однієї мембрани складає 0,1 мкл.

Для формування референтних мембран (мембран порівняння), усі процедури з приготування розчинів та нанесення мембран виконувались так само, як і для формування робочих ферментних мембран, але замість ферментів в розчині додавали БСА за тих же самих концентрацій. Після іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв’язаних компонентів біомембрани та надлишку глутарового альдегіду.

2.4. Кондуктометричні перетворювачі

При створенні кондуктометричних перетворювачів в якості матеріалу для виготовлення використовуються благородні метали, а для підкладки - непровідні матеріали, а саме скло або кераміка. Матеріал підкладки, як правило, не впливає на чутливість кондуктометричного перетворювача. Кондуктометричні електроди

найчастіше виготовляються фотолітографічним способом після термовакуумного напылення шару золота на підкладку із ситалу [13].

Саме цей підхід був використаний для створення кондуктометричних перетворювачів, використаних в даній роботі. Використовувались перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.С. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5×30 мм та складаються з двох ідентичних золотих гребінчастих електродів (рис. 2). Кожна така система складається із 20 пар растрових електродів, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм^2 .

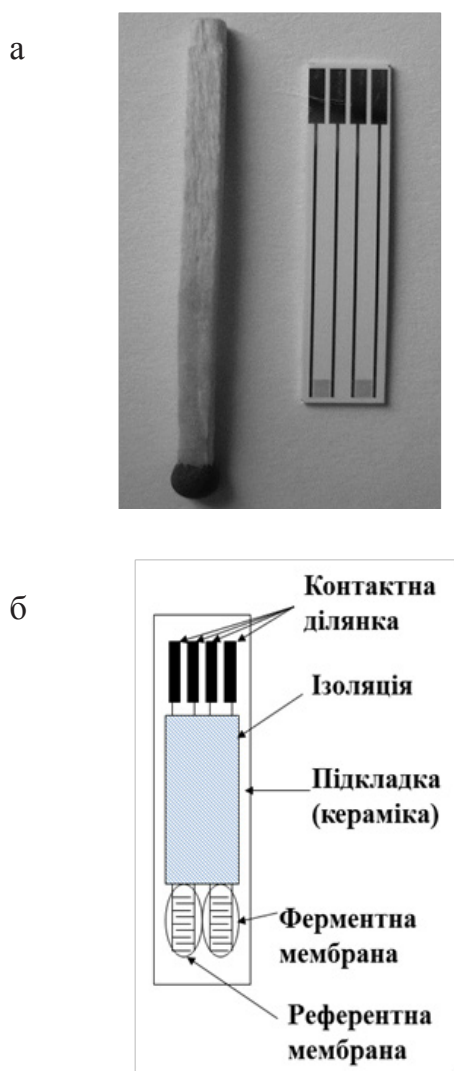


Рис. 2. Зовнішній вигляд (а), та схема будови (б) кондуктометричного перетворювача на основі золотих гребінчастих електродів нанесених на ситалову основу

2.5. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань на основі портативного аналізатора «МСП-3»

На рис. 3 представлено схему експериментальної кондуктометричної установки для проведення біосенсорних вимірювань, де зліва приведено схематичний вигляд самого біосенсора. На одну пару електродів (1) цього біосенсора наносили робочу мембрану на основі ферментів (3). На другу пару електродів (2) наносили референтну мембрану на основі БСА (4). Портативний кондуктометр «МСП-3» (5) був розроблений та виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України. Також кондуктометрична схема включала в себе тримач для біосенсора (6) і штатив (7). При проведенні вимірювань на основу штативу встановлюють робочу комірку (8) з досліджуванним розчином (9), а весь сенсорний блок встановлюють на магнітний перемішувачий пристрій (10). Портативний вимірювальний прилад «МСП-3» підключається до електромережі через адаптер мережі живлення (11), до біосенсору - сполучними дротами через контакт (12), а до персонального комп'ютера (13) зі встановленим пакетом відповідного програмного забезпечення - через контакт (14). Вимірювання проводили при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ.

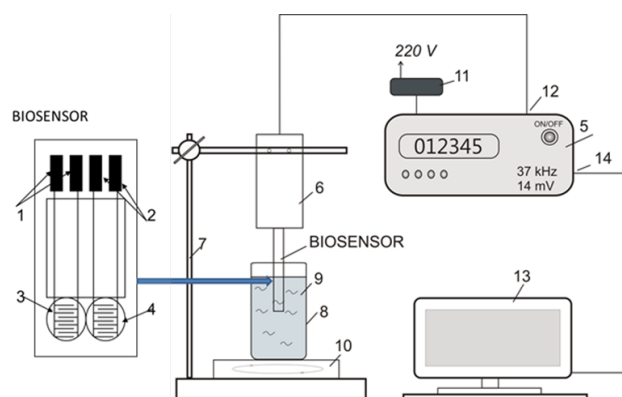


Рис. 3. Схема кондуктометричної установки на основі портативного аналізатора «МСП-3»

2.6. Методика вимірювання

Біосенсор поміщали у робочу комірку об'ємом 2 мл, заповнену буферним розчином. Після отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) в комірку з робочим буфером додавали певну аліквоту вихідного розчину субстрату. Концентрацію субстратів змінювали додаванням до робочого буферу відповідних порцій концентрованих вихідних розчинів субстратів.

Усі дослідження проводилися щонайменше із 3-кратним повторенням. Завдяки використанню диференційного режиму вимірювань, неспецифічних змін вихідного сигналу, пов'язаних зі зміною температурних показників, рН середовища, електричними наводками, не спостерігалось.

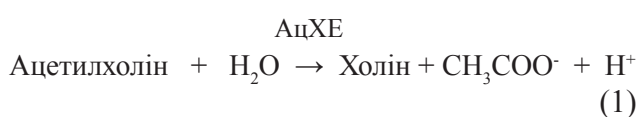
Результати наведено, як середньо квадратичне значення \pm квадратична похибка середнього значення за результатами n незалежних експериментів. Різницю між двома групами оцінювали за допомогою t -тесту Ст'юдента, статистично достовірною вважалася різниця, коли $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження впливу додавання наночастинок золота до біоселективного елементу біосенсора на його функціонування, необхідно перевірити основні аналітичні характеристики біосенсора за традиційної процедури іммобілізації ферментів та з використанням наночастинок.

Відповідно першим етапом даної роботи необхідно було оптимізувати умови іммобілізації АцХЕ з наночастинками, щоб далі порівняти отримані аналітичні характеристики даного біосенсора з біосенсором на основі традиційного методу іммобілізації.

Робота біосенсора на основі АцХЕ ґрунтується на наступній ферментативній реакції:



В процесі проходження ферментативної реакції (1) при каталітичній дії ацетилхолінесте-

рази відбувається розщеплення ацетилхоліну на холін та оцтову кислоту. Оцтова кислота дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому збільшується локальна концентрація іонів в робочій мембрані, що, відповідно, призводить до зміни провідності розчину в приелектродній області, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем [14, 15].

В даній роботі іммобілізацію АцХЕ з наночастинками золота на поверхню кондуктометричних перетворювачів проводили в розчині ГА, при цьому глутаровий альдегід утворював ковалентні зв'язки між ферментом та допоміжними речовинами (БСА); під час цього процесу активність ферменту змінювалась, в залежності від концентрації ГА та часу іммобілізації.

Для підбору оптимальної концентрації ГА виготовляли біоселективні елементи з масовою часткою ГА від 0,2% до 1%. Відгуки на субстрат (100 мкМ ацетилхолін) були дуже маленькими за концентрації ГА - 1%. Це пояснюється тим, що залишкова активність ферменту після іммобілізації в присутності високої концентрації ГА була низькою. Втім, за низької концентрації ГА (0,2%) відгуки на ацетилхолін (АцХ) були значно більші, але спостерігалось поступове зменшення цих відгуків біосенсора під час багаторазового використання, обумовлене поступовим вимиванням ферменту з біоселективного елементу. Тому для подальшої роботи було вирішено використовувати концентрацію ГА 0,4% при іммобілізації ферменту в біоселективному елементі біосенсора, за якої відгуки на субстрат були достатньо високі, а швидке зменшення відгуків при безперервній роботі не спостерігалось.

Також було перевірено роботу біосенсора в залежності від тривалості процесу іммобілізації ферменту (створення біоселективного елементу) (від 20 до 40 хвилин). При іммобілізації протягом 20 хв спостерігалось поступове зменшення відгуків впродовж роботи біосенсора, обумовлене недостатньо стійкою іммобілізацією ферменту, а при іммобілізації 40 хв відгуки були менші, ніж в решті випадків, ймовірно через сильне зшивання ферменту. Для подальших іммобілізацій було обрано оптимальний час - 25 хв, за якого відгуки біосенсорів були достатньо великими та стабільними.

Аналітичні характеристики біосенсора також залежать від складу біоселективної мембрани. Цей параметр суттєво впливає на чутливість біосенсора, саме тому необхідно було підібрати оптимальне співвідношення компонентів в біоселективній мембрані. Наступним експериментом був підбір оптимального співвідношення колоїдного розчину наночастинок золота (концентрація 38,6 мкг/мл) з ферментною сумішшю (5% АцХЕ) під час іммобілізації. В результаті було отримано низку біосенсорів на основі різних співвідношень цих двох розчинів (5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5). Перевірялась залежність відгуків біосенсорів від співвідношення АцХЕ та НЧЗ, а саме відгуки біосенсора в стані ферментативного насичення субстратом (2 мМ ацетилхолін) (Рис. 4). Як видно з рисунка, оптимальне співвідношення розчинів фермента і наночастинок золота – 3:1, відповідно.

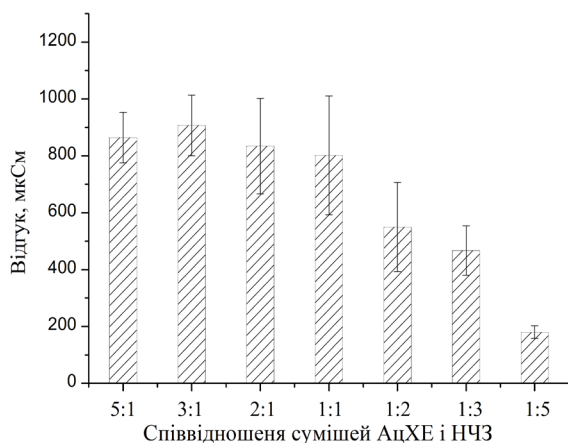


Рис. 4. Відгуки АцХЕ-біосенсорів на основі різних співвідношень фермента і наночастинок золота в біоселективному елементі. Концентрація субстрату - 2 мМ ацетилхоліну

Щоб перевірити вплив різних концентрацій НЧЗ на характеристики біосенсорів, було створено групу біосенсорів на основі АцХЕ та НЧЗ (30 нм) за їх різноманітних концентрацій в біоселективних мембранах. Для кожного з цієї групи біосенсорів було отримано кілька відгуків на концентрації АцХ, що лежать на лінійній частині калібрувальних кривих АцХЕ-біосенсора (рис. 5), за якими можна охарактере-

ризувати чутливість біосенсора. Аналізуючи отримані результати (табл. 1) видно, що при концентрації НЧЗ 38,6 мкг/мл та 19,3 мкг/мл відгуки біосенсорів практично не змінювались порівняно з біосенсором на основі лише 9,65 мкг/мл.

Таблиця 1

Порівняння чутливості АцХЕ-біосенсорів на основі різних концентрацій наночастинок золота до субстрату

Концентрація субстрату у вимірювальній комірці	Сигнали біосенсорів на основі АцХЕ з 30 нм НЧЗ різної концентрації		
	38,6 мкг/мл	19,3 мкг/мл	9,65 мкг/мл
0,1 мМ АцХ	149	139	102
0,2 мМ АцХ	297	265	196
0,5 мМ АцХ	701	638	457

Для аналізу впливу наночастинок золота на іммобілізацію біологічного матеріалу та функціонування біосенсорів, необхідно було порівняти основні характеристики біосенсорів з та без додавання наночастинок золота $\varnothing 20$ нм та 30 нм. Для кращого порівняння у всіх варіантах іммобілізації було використано однакову кількість ферменту.

За результатами досліджень побудовано калібрувальні графіки для кожного типу біосенсора (Рис.5).

За отриманими калібрувальними кривими видно, що найкращою чутливістю до субстрату (АцХ) характеризувались біосенсори на основі наночастинок золота 30 нм. Але лінійний діапазон роботи був кращим для біосенсора на основі традиційної методики іммобілізації без наночастинок. Окрім самих калібрувальних кривих для аналізу шуму, дрейфу та мінімальної границі визначення оцінювали параметри реальних відгуків біосенсорів на різні концентрації АцХ. Вплив на такі важливі аналітичні характеристики біосенсора, як чутливість, мінімальна границя визначення, лінійний діапазон роботи, шум та дрейф базової лінії, було скомпоновано в таблиці 2 для усіх варіантів біосенсорів.

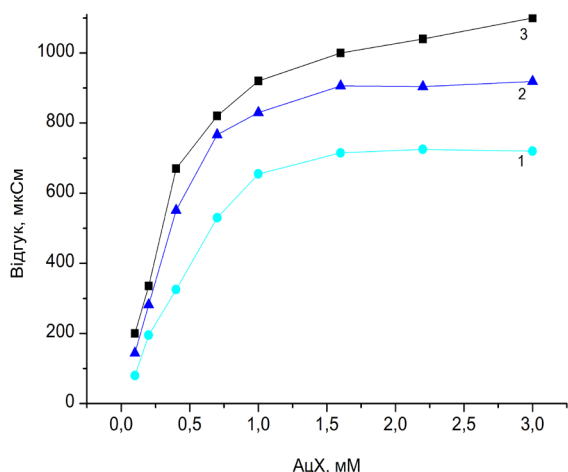


Рис. 5. Калібрувальні криві біосенсора на основі ацетилхолінестерази без використання наночастинок (крива 1), з наночастинками золота 20 нм (крива 2) та з наночастинками золота 30 нм (крива 3)

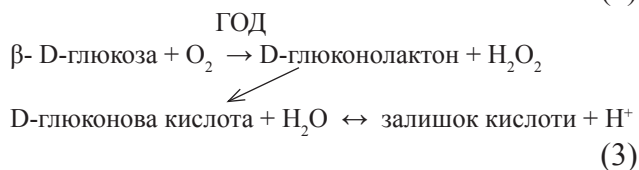
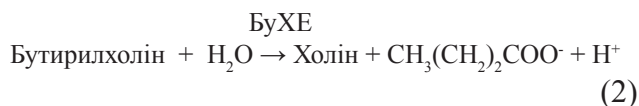
Таблиця 2

Порівняння характеристик біосенсорів на основі різних варіантів іммобілізації

Характеристики біосенсорів	Варіанти іммобілізації		
	в краплі ГА без НЧЗ	в краплі ГА з НЧЗ (30 нм)	в краплі ГА з НЧЗ (20 нм)
Чутливість, мкСм/мМ	783	1835	1354
Мінімальна границя визначення, мкМ	2,0	1,0	1,5
Лінійний діапазон роботи, мМ	до 0,7	до 0,4	до 0,4
Дрейф, мкСм /хв	12,3	12,1	15,3
Шум, мкСм	5,2	6,1	6,8

Отже, було показано, що цілком можливим та перспективним є створення біосенсорів шляхом коіммобілізації ферменту з НЧЗ, причому даний варіант іммобілізації не поступався за ефективністю поширеній методиці іммобілізації АцХЕ в розчині ГА.

Метою наступного етапу роботи було показати, чи ці ж НЧЗ (30 нм) можуть бути використані і для іммобілізації інших часто використовуваних в біосенсоріці ферментів – бутирилхолінестерази (БуХЕ) та глюкозооксидази (ГОД). Ці ферменти каталізують перетворення бутирилхоліну (БуХ) (2) та глюкози (3):



В даних реакціях відбувається утворення іонів, які призводять до зміни провідності розчину, що може реєструватись кондуктометричним перетворювачем [14, 15].

Ми використали для іммобілізації НЧЗ з розміром частинок 30 нм, оскільки в попередній частині роботи саме вони показали найкращі результати при розробці АцХЕ-біосенсорів. Отримані калібрувальні криві біосенсорів на основі коіммобілізації ферментів (БуХЕ та ГОД) з НЧЗ було порівняно з калібрувальними кривими біосенсорів на основі традиційної іммобілізації в розчині глутарового альдегіду (рис. 6). Виявилось що використання НЧЗ в складі БуХЕ-біосенсора позитивно вплинуло на чутливість даного біосенсора до БуХ (рис. 6а). Біосенсори на основі ГОД з НЧЗ, були придатні до використання, хоча, як видно з рисунку 6б, вони мали трошки вузький лінійний діапазон роботи, а чутливість до глюкози була практично однаковою з біосенсорами на основі лише ГОД.

Ще однією з важливих характеристик біосенсорів є відтворюваність роботи біосенсорів. Щоб дослідити, як наявність НЧЗ у мембрані біосенсора впливає на цей показник, ми протягом одного робочого дня з інтервалом 40 хвилин отримували відгуки біосенсорів на основі різних ферментів (АцХЕ, БуХЕ та ГОД) з та без НЧЗ на 1 мМ концентрацію відповідного субстрату. При цьому всі варіанти біосенсорів, що тестувались, весь час між вимірюваннями залишались у робочому буферному розчині за

кімнатної температури. Для порівняння було пораховано середньоквадратичну похибку вимірювань. Як видно з рис. 7, усі біосенсори на основі різних ферментів з/без НЧЗ при квазі-безперервній роботі протягом дня характери-

зувалися високою відтворюваністю сигналів. Відповідно додавання до біоселективних елементів НЧЗ майже не вплинуло на стабільність роботи біосенсорів.

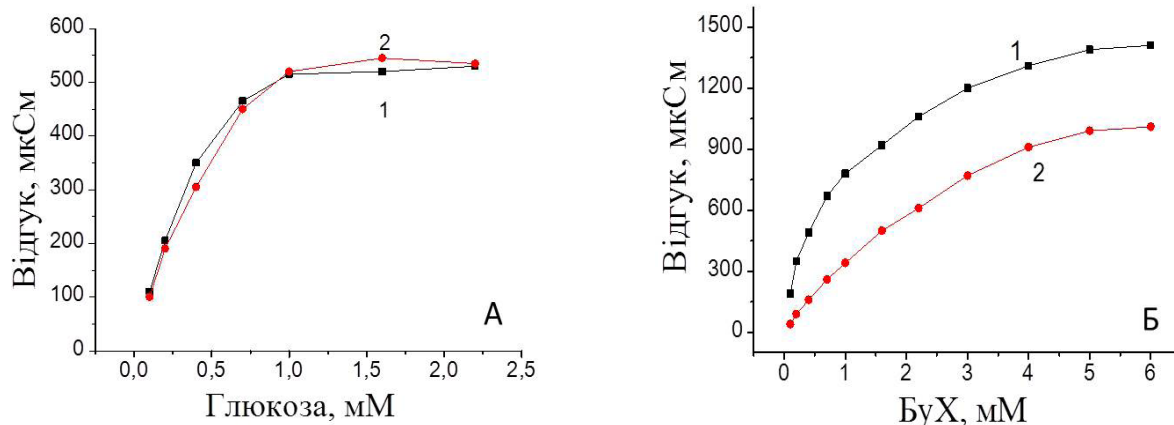


Рис. 6. Калібрувальні криві біосенсора на основі глюкозооксидази (а) та бутирилхолінестерази (б) без наночастинок (1) та з 30 нм НЧЗ (2)

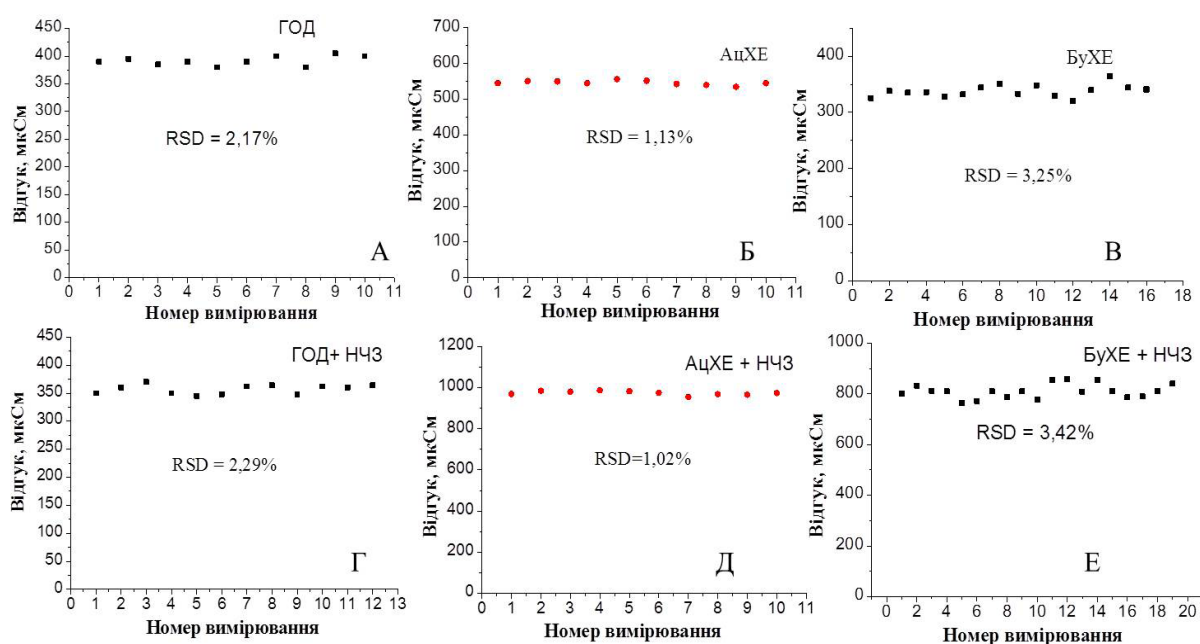


Рис. 7. Відтворюваність сигналів біосенсорів на основі різних ферментних систем: ГОД (а), АцХЕ (б), БуХЕ (в), ГОД + НЧЗ (г), АцХЕ + НЧЗ (д), БуХЕ + НЧЗ (е) протягом одного робочого дня. Концентрація субстратів – 1 мМ

Важливою характеристикою будь-якого біосенсора є відтворюваність його приготування (інтер-відтворюваність відгуків), вона відображається у середньоквадратичному відхиленні відгуків біосенсорів, отриманих при різних варіантах іммобілізації ферменту в складі біоселективного елементу на поверхню одного й того ж перетворювача. Цей параметр особливо важливий при виробництві великих партій біосенсорів у промислових умовах, а при лабораторній розробці біосенсорів ним часто нехтують. Так, при кількох іммобілізаціях ферментів у плутаровому альдегіді спостерігається значна розбіжність відгуків біосенсора, яка обумовлена як людським фактором (оскільки саме дослідник наносить шар розчину ферментів, з якого буде формуватись чутлива мембрана), так і випадковими змінами в умовах іммобілізації. Щоб довести, що додавання НЧЗ до біоселективних елементів негативно не впливає на характеристики біосенсорів, була проведена перевірка відтворюваності приготування біосенсорів на основі різних ферментів з/без НЧЗ. Пораховано середньоквадратичне від-

хилення відгуків біосенсорів при різних варіантах іммобілізації ферментів з/без НЧЗ (рис. 8). Як і очікувалось, іммобілізація ферментів за наявності НЧЗ була не гіршою, а для АцХЕ та БуХЕ навіть трошки кращою, що є ще однією перевагою даного методу іммобілізації ферментів (методу створення біоселективного елементу біосенсора).

Далі було проведено ряд дослідів по вивченню стабільності біосенсорів на основі різних варіантів іммобілізації ферментів з/без НЧЗ при зберіганні. Біосенсори зберігались в сухих умовах при температурі +4°C. Активність біоселективних елементів на основі ГОД та АцХЕ, в склад яких входили НЧЗ залишалась стабільною щонайменше 7 діб (втрата активності до 7 %). За той же час зберігання, до 9 % активності втратили біосенсори на основі лише ферментів (без використання наночастинок). Гірша ситуація склалась з біосенсорами на основі БуХЕ з та без НЧЗ, вони за 7 діб втратили більше 20 % активності.

Відповідно отримані результати, по перевірці впливу додавання НЧЗ в біоселективний

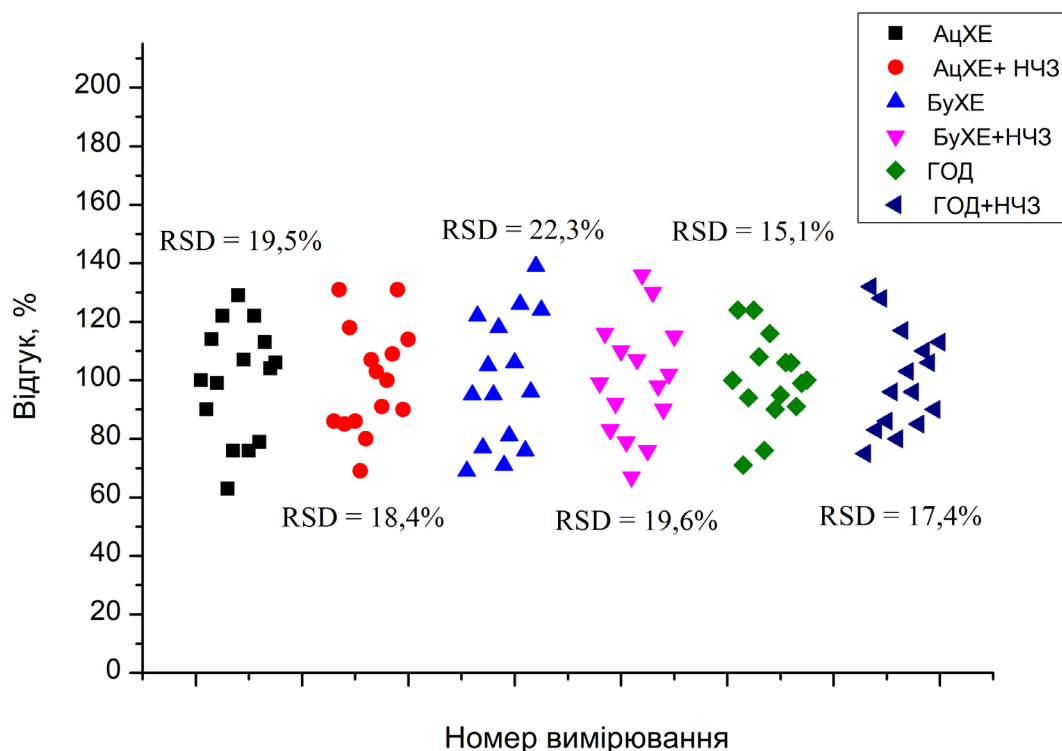


Рис. 8. Відтворюваність відгуків біосенсорів від різних іммобілізації без та з додаванням НЧЗ у біоселективну мембрану. Концентрація субстратів – 1 мМ

елемент біосенсора, свідчать про перспективність роботи в даному напрямку. Застосування запропонованої методики іммобілізації щонайменше покращило чутливість АцХЕ- та БуХЕ-біосенсорів і негативно не вплинуло на інші характеристики.

4. ВИСНОВКИ

В роботі було досліджено перспективність застосування наночастинок золота для модифікації кондуктометричних ферментних біосенсорів з метою покращення їхніх аналітичних характеристик. Проведено оптимізацію умов коіммобілізації ферменту з НЧЗ, підбрано оптимальну концентрацію глютарового альдегіду – 0,4% та тривалість іммобілізації – 25 хв (іммобілізація АцХЕ з НЧЗ). Вибрано найкраще співвідношення сумішей ферменту (5-10 %) та НЧЗ 30 нм (38,6 мкг/мл) при нанесенні мембран на перетворювач - 3:1, відповідно. Досліджено вплив концентрації НЧЗ та діаметру наночастинок на чутливість біосенсора.

Аналітичні характеристики біосенсорів на основі ферментів та НЧЗ було порівняно з характеристиками біосенсора на основі лише одних ферментів. Показано, що відтворюваність відгуків за безперервної роботи та стабільність приготування біосенсорів на основі наночастинок не гірша ніж у біосенсорів на основі лише ферментів (без НЧЗ). Також порівняно стабільність при зберіганні обох варіантів біосенсорів на основі різних ферментів. Усі біосенсори на основі коіммобілізації ферментів з НЧЗ зберігались трошки краще за біосенсори на основі тих же ферментів без НЧЗ.

Доведено, що додавання НЧЗ до біоселективних елементів може покращити чутливість біосенсорів та інші параметри, що є позитивним результатом даної роботи.

5. ПОДЯКА

Робота була проведена завдяки фінансовій підтримці від Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проєктів із виконання наукових досліджень і розробок “Підтримка досліджень провідних та молодих учених” (проєкт 2020.02/0097) та НАН Укра-

їни в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України ««Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

Список використаної літератури

- [1]. K. Kerman, M. Saito, E. Tamiya, S. Yamamura and Y. Takamura, Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2008, 27, 585–592.
- [2]. J. A. Hondred, J. C. Breger, N. T. Garland, E. Oh, K. Susumu, S. A. Walper, I. L. Medintz and J. C. Claussen, Enhanced enzymatic activity from phosphotriesterase trimer gold nanoparticle bioconjugates for pesticide detection. *Analyst*, 2017, 142, 3261–3271.
- [3]. X. Yang, M. Feng, J. Xia, F. Zhang, Z. Wang An electrochemical biosensor based on AuNPs/Ti3C2 MXene three-dimensional nanocomposite for microRNA-155 detection by exonuclease III-aided cascade target recycling, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, 878, 114669
- [4]. L. Jia, Y. Zhou, K. Wu, Q. Feng, Ch. Wang, P. He, Acetylcholinesterase modified AuNPs-MoS₂-rGO/PI flexible film biosensor: Towards efficient fabrication and application in paraoxon detection, *Bioelectrochemistry*, 2019, 131, 107392
- [5]. Y. Zhang, X. Li, D. Li, Q. Wei, A laccase based biosensor on AuNPs-MoS₂ modified glassy carbon electrode for catechol detection *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 186, 110683
- [6]. F. W. P. Ribeiro, M. F. Barroso, S. Morais, S. Viswanathan, P. de Lima-Neto, A. N. Correia, M. B. P. P. Oliveira and C. Delerue-Matos, Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. *Bioelectrochemistry*, 2014, 95, 7–14.
- [7]. G. A. Valencia, L. C. de Oliveira Vercik and A. Vercik, A new conductometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on chitosan and chitosan/gold nanoparticle films. *J. Polym. Eng.*, 2014, 34(7), 633–638.
- [8]. C. Vaghela, M. Kulkarni, S. Haram, R. Aiyer and M. Karve, A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped

biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 108, 32–40.

[9]. Y. Zhou, M. Wang, H. Yin and S. Ai, Amperometric determination of the activity of protein kinase a using a glassy carbon electrode modified with IgG functionalized gold nanoparticles conjugated to horseradish peroxidase. *Microchim. Acta*, 2017, 184, 3301–3308.

[10]. V. Pavlov, Y. Xiao and I. Willner, Inhibition of the Acetylcholine esterase-stimulated growth of au nanoparticles: nanotechnology-based sensing of nerve gases. *Nano Lett.*, 2005, 5, 649–653.

[11]. Frens G, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science*, 1973, 241, 20–22.

[12]. Turkevich, J., Hillier, J., Stevenson, P. C., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Disc. Farad. Soc.*, 1951, 11, 55.

[13]. Dzyadevych S. V., *Konduktometrychni fermentni biosensory: teoriia, tekhnolohiia, zastosuvannia. Biopolimery i klityna*. 2005, 21, 91–106 (in Ukrainian).

[14]. Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S.V., Conductometric microbiosensors for environmental monitoring, *Sensors* 2008, 8, 2569–2588.

[15]. Soldatkin O. O., Sosovska O. F., Benilova I. V. ta in., Enzymnyi konduktometrychnyi sensor dlia vyznachennia kontsentratsii formaldehidu u modelnykh zrazkakh *Biopolimery i klityna* 2005, 21, 425–432 (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 24.02.2021 р.

UDC 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2021.1.227408>

APPLICATION OF GOLD NANOPARTICLES FOR IMPROVEMENT OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF CONDUCTOMETRIC ENZYME BIOSENSORS

O. O. Soldatkin^{1,4}, O. V. Soldatkina², V. M. Arkhypova¹, I. I. Piliponskiy¹, L. S. Rieznichenko², T. G. Gruzina², S. M. Dybkova², S. V. Dzyadevych^{1,3}, A. P. Soldatkin^{1,3}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine.
Zabolotnogo Str., 150, Kyiv-03143, Ukraine.

²F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry NAS of Ukraine.
Vernadskogo Ave, 42, Kyiv, 03142, Ukraine.

³Taras Shevchenko National University of Kyiv.
Volodymyrska Street, 64/13. Kyiv- 01601, Ukraine.

⁴National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”,
Prosp.Peremohy, 37, Kyiv-03056, Ukraine.

Summary

Gold nanoparticles are perspective materials for using in biosensorics. It is a bio-intelligent material that can fix the metabolic links between organic substances (for example, cysteine residues of enzymes). These nanoparticles formulate a kind of microenvironment for immobilization of the enzyme during biosensor development. Also the activity of the immobilized enzyme can be saved by using of immobilization on gold nanoparticles.

The aim of the work was to study the influence of gold nanoparticles on the analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors.

Methods: The conductometric method of analysis has been used. Two pairs of gold interdigitated electrodes deposited on a sital substrate were used as a conductometric transducer. For bioselective

elements formation, the following enzymes: acetylcholinesterase, buterylcholinesterase and glucose oxidase were used. Enzymes and gold nanoparticles are coimmobilized by crosslinking of glutaraldehyde on transducers surface.

Results: In this work, the conditions of immobilization of the enzyme with gold nanoparticles were optimized. It was selected the optimal concentration of the cross-linking agent (glutaraldehyde), duration of the immobilization, enzyme/gold nanoparticles ratio, and the concentration and size of gold nanoparticles. The work characteristics of biosensors based on enzymes and gold nanoparticles were compared to the same characteristics of biosensors based on enzymes only. It was investigated the influence of the addition of gold nanoparticles to the bioselective element of biosensors on their stability. It was checked reproducibility of uninterrupted biosensors work, the reproducibility of preparing biosensors, and the stability of the biosensors.

Conclusions: Application of gold nanoparticles in bioselective elements can improve some characteristics of biosensors, which may be promising for further study and use.

Keywords: conductometric biosensor biosensor, enzyme, gold nanoparticles, acetylcholinesterase, buterylcholinesterase, glucose oxidase, bioselective elements.

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2021.1.227408>

ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ

*О. О. Солдаткін^{1,4}, О. В. Солдаткіна², В. М. Архипова¹, І. І. Пилипонський¹, Л. С. Резніченко²,
Т. Г. Грузіна², С. М. Дибкова², С. В. Дзядевич^{1,3}, О. П. Солдаткін^{1,3}*

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного 150, Київ, 03143, Україна.

²Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України,
бульвар Академіка Вернадського, 42, Київ, 03142, Україна

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01003, Україна,

⁴Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського», пр-т Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

Реферат

Наночастинки золота є перспективним матеріалом для використання в біосенсоріці. Вони є біосумісними і можуть утворювати міцні тілові зв'язки між органічними речовинами (наприклад, залишками цистеїну ферментів). Під час приготування біосенсорів, наночастинки утворюють відповідне мікросередовище для іммобілізації ферменту. Також, активність іммобілізованого ферменту може бути збережена шляхом іммобілізації на золотих наночастинках.

Метою даної роботи було дослідити вплив наночастинок золота на аналітичні характеристики кондуктометричних ферментних біосенсорів.

Методи дослідження: В роботі використовували кондуктометричний метод аналізу. Як кондуктометричні перетворювачі використовували золоті гребінчасті електроди, нанесені на підкладку з ситалу. Під час роботи кондуктометричного перетворювача застосовувався дифе-

ренційний режим вимірювання. Для створення біоселективних елементів біосенсорів використовували ферменти: ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза та глюкозооксидаза. Ферменти та наночастинки золота було коїмобілізовано ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом на поверхні перетворювачів.

Результати дослідження: В роботі оптимізували умови іммобілізації ферменту з наночастинками золота. Підбрано оптимальну концентрацію зшиваючого агенту, тривалість іммобілізації, співвідношення ферменту та НЧЗ, концентрацію та розмір НЧЗ. Досліджено робочі характеристики біосенсорів на основі ферментів і НЧЗ та порівняно їхні з характеристиками біосенсорів на основі лише ферментів. Також досліджувалось, як додавання НЧЗ до біоселективного елементу біосенсорів впливає на стабільність біосенсорів. Перевірено відтворюваність безперервної роботи біосенсорів, відтворюваність приготування біосенсорів та їх стабільність при зберіганні.

Висновки: Використання НЧЗ в складі біоселективних елементів може покращити деякі характеристики біосенсорів, що є перспективним для подальшого вивчення та використання.

Ключові слова: біосенсор, фермент, наночастинки золота, ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза, глюкозооксидаза, кондуктометрія, біоселективні елементи.