

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94
DOI: 10.18524/1815-7459.2021.3.241060

**РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ
ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ СУМАРНОГО ВМІСТУ ІНДОЛЬНИХ
АЛКАЛОЇДІВ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ
(*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. EX KURZ)**

*В. М. Архипова¹, О. О. Солдаткін¹, Л. П. Можилевська¹,
І. І. Конвалюк¹, В. А. Кунах¹, С. В. Дзядевич^{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

e-mail авторів: avalka@yahoo.com, alex_sold@yahoo.com, l.mozhylevska@gmail.com,
konvalyuk.i.i@gmail.com, kunakh@imbg.org.ua, dzyad@yahoo.com

**РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ
ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ СУМАРНОГО ВМІСТУ ІНДОЛЬНИХ
АЛКАЛОЇДІВ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ
(*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. EX KURZ)**

*В. М. Архипова, О. О. Солдаткін, Л. П. Можилевська,
І. І. Конвалюк, В. А. Кунах, С. В. Дзядевич*

Анотація. Створено лабораторний прототип ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz. Біосенсор характеризувався високою чутливістю до загального вмісту індольних алкалоїдів (мінімальна межа визначення – 0,5 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів, які знаходяться в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналізу був від 2 до 15 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів. Аналіз індольних алкалоїдів за допомогою біосенсора є простим та швидким та не потребує дороговартісного обладнання та спеціальної підготовки проб для проведення аналізу на відміну від традиційних методів. Створений біосенсор в подальшому може використовуватись для контролю сумарного вмісту індольних алкалоїдів у сучасних біотехнологічних і фармацевтичних процесах виробництва ліків та біологічно активних добавок.

Ключові слова: ацетилхолінестераза, біосенсор, рН-чутливий польовий транзистор, індольні алкалоїди, *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz., культура тканин рослин

**DEVELOPMENT OF AN ENZYME BIOSENSOR BASED
ON pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR ESTIMATING
THE TOTAL CONTENT OF INDOLE ALKALOIDS IN TISSUE CULTURE
OF *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. EX KURZ**

*V. M. Arkhypova, O. O. Soldatkin, L. P. Moghylevska, I. I. Konvalyuk,
V. A. Kunakh, S. V. Dzyadevych*

Abstract. A laboratory prototype of an enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors has been developed to determine the total content of indole alkaloids in *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz tissue culture. The biosensor was characterized by high sensitivity to the total content of indole alkaloids (minimum limit of determination – 0.5 µg/ml of the total content of indole alkaloids contained in the juice obtained from tissue culture of *Rauwolfia serpentina*). The linear range of biosensor determination of the analyte was from 2 to 15 µg / ml of the total content of indole alkaloids. Analysis of indole alkaloids using a biosensor is simple and fast and does not require expensive equipment and special sample preparation for analysis, unlike traditional methods. The created biosensor can be further used to control the total content of indole alkaloids in modern biotechnological and pharmaceutical processes for the production of drugs and biologically active additives.

Keywords: acetylcholinesterase, biosensor, pH-sensitive field-effect transistor, indole alkaloids, *Rauwolfia serpentina*, plant tissue culture

**РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТНОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ рН-
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СУММАРНОГО
СОДЕРЖАНИЯ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ РАУВОЛЬ-
ФИИ ЗМЕИНОЙ
(*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. EX KURZ)**

*В. Н. Архипова, А. А. Солдаткин, Л. П. Можилевская, И. И. Конвалюк,
В. А. Кунах, С. В. Дзядевич*

Аннотация. Создан лабораторный прототип ферментного биосенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов для определения суммарного содержания индольных алкалоидов в культуре тканей раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz. Биосенсор характеризовался высокой чувствительностью к общему содержанию индольных алкалоидов (минимальный предел определения – 0,5 мкг/мл суммарного содержания индольных алкалоидов, находящихся в соке, полученном из культуры тканей раувольфии змеиной). Линейный диапазон биосенсорного определения аналита был от 2 до 15 мкг/мл суммарного содержания индольных алкалоидов. Анализ индольных алкалоидов с помощью биосенсора является простым и быстрым и не требует дорогостоящего оборудования и специальной подготовки проб для проведения анализа в отличие от традиционных методов. Созданный биосенсор в дальнейшем может использоваться для контроля суммарного содержания индольных алкалоидов в современных биотехнологических и фармацевтических процессах производства лекарств и биологически активных добавок.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, биосенсор, рН-чувствительный полевой транзистор, индольные алкалоиды, *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz., культура тканей растений

Вступ

На сьогодні велика увага в медичній практиці приділяється індолюним алкалоїдам, які володіють помітною фізіологічною активністю. Індолюні алкалоїди – це клас алкалоїдів, які містять у своїй структурі ядро індолу або його похідних. Деякі з них знаходять застосування в медицині [1]. Більша частина фізіологічних ефектів цих алкалоїдів пов'язана з їх дією на центральну і периферичну нервові системи [2, 3].

Велика увага приділяється раувольфії зміїній (*Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz.),

яка протягом тисячоліть культивується в Індії як лікарська і декоративна рослина.

Коріння і кореневища раувольфії зміїної містять до 3% алкалоїдів, монотерпеноїдних похідних індолу (резерпін, ресцінамін, аймалін, аймаліцин, ізоаймалін, раухімбін, ізо-раухімбін, раувольфінін, резерпілін, резерпенін, сарпагін, серпентин, серпентінін, серпін, 3-епі-7-іохімбін, аллохімбін, 7-іохімбін, тебаїн, папаверин, чаїндрин – всього понад 50 алкалоїдів) [4].

Найбільш важливі з них резерпін, аймаліцин і аймалін (рис. 1).

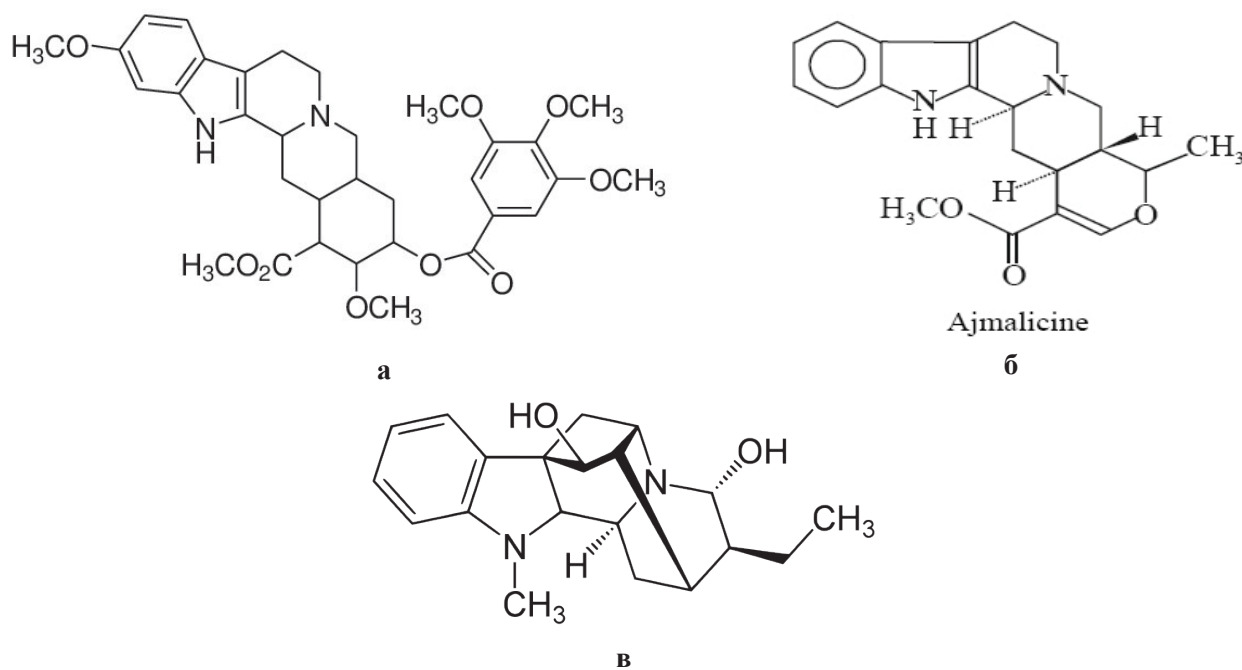


Рис. 1. Структурні формули а) резерпіну, б) аймаліцину і в) аймаліну

Резерпін застосовується для зниження кров'яного тиску при гіпертонічній хворобі, а також при психічних розладах. Аймаліцин знижує кров'яний тиск аналогічним шляхом і застосовується при лікуванні периферичних і церебральних судинних захворювань. Аймалін володіє нейролептичною активністю, помірно знижує артеріальний тиск, посилює коронарний кровообіг, має негативний іотропний ефект і помірну адренолітичну дію [5, 6].

Коріння і кореневища раувольфії зміїної здавна застосовуються в народній меди-

цині при різних захворюваннях людини та у ветеринарній практиці як ліки від зміїних укусів, лихоманки, божевілля, для зниження кров'яного тиску при гіпертонічній хворобі, а також при лікуванні периферичних і церебральних судинних захворювань. На основі сумарних екстрактів раувольфії або окремих очищених алкалоїдів розроблено ряд фармацевтичних препаратів: Aritmina, Aphrodyne, Lamuran, Raunatin, Rauwasan, Rauworur, Pressimed, Serpasil, Yohimex та інші. Дефіцит природної сировини – коренів *R. serpentina*, зумовив розробку нових біотехнологій отри-

мання рослинної біомаси, що містить цільові біологічно активні сполуки, а також є асептичною, за якістю близькою або навіть кращою за сировину, яку заготовляють у природі [8, 9]. В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розроблено альтернативний біотехнологічний метод отримання алкалоїдів з біомаси культури тканин раувольфії зміїної, вирощеної в умовах *in vitro* [7]. Отриманий штам культури тканин *R. serpentina* К-27 істотно відрізняється за вмістом алкалоїдів порівняно з коренями рослин з природи. У біомасі культури тканин *R. serpentina*, вирощуваній як у лабораторних, так і в промислових умовах, накопичуються, окрім аймаліну і його похідних (0,9–1,4% від сухої біомаси), воміленін (0,1–0,4%), резерпін, серпентин, аймаліцин, ресцинамін (не більше, ніж 0,05% кожен) [8, 9]. Отже, актуальною є розробка методів контролю наявності сумарного вмісту індольних алкалоїдів у клітинній біомасі *R. serpentina* з метою подальшого її використання у фармацевтичних цілях.

Існує ряд вивчених та широко використовуваних методів для якісного та кількісного визначення індольних алкалоїдів (об'ємний, колориметричний, спектрофотометричний, флуориметричний та ін.) [10–12], які, однак, мають основний недолік – дороговартісну, довготривалу та складну методику підготовки проб, що може призвести до суттєвих помилок результатів біохімічного аналізу. Тому, на сьогодні постає актуальне питання створення зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів у біомасі раувольфії зміїної.

Метою роботи було розробити та дослідити можливість використання біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) для аналізу сумарного вмісту індольних алкалоїдів у культурі тканин раувольфії зміїної.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали

Для виготовлення біоселективної мембрани використовували фермент аце-

тилхолінестераза (АцХЕ) із *Electrophorus electricus* (ЕС 3.1.1.7) активністю 425,94 од. акт./мг (Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V) (Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) («ч. д. а.», Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), гліцерол (чистота 99%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина).

Як субстрат використовували ацетилхолін хлорид (АцХХ, чистота 99%) фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина).

Фосфатний буфер був виготовлений з дигідроортофосфат калію (KH_2PO_4) (чистота 98.5%, Helicon, Росія) та гідроксиду натрію (NaOH) (чистота 99%, Helicon, Росія).

Потенціометричні датчики і портативний вимірювальний пристрій

Потенціометричні перетворювачі були вироблені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Датчик складається з двох ідентичних пар транзисторів р-канального типу ($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -ISFETs), розташованих на монокристалічній кремнієвій підкладці загальною площею 8×8 мм. Один транзистор є робочим електродом, а другий використовується як електрод порівняння. Сенсорні елементи, що використовувались в роботі, демонстрували рН-чутливість приблизно 40 мВ/рН, забезпечуючи тим самим рН-чутливість струму в каналі транзистора приблизно 15–20 мкА/рН. Гранична напруга рН-ПТ складала близько 2,5 В. Виміри проводилися з початкової величини струму в каналі близько 500 мкА, напруга витік-стік складала приблизно 2 В. На рис. 2. зображено загальний вигляд сенсора та наближене зображення біоселективної мембрани, отримане за допомогою оптичної мікроскопії.

Виміри проводилися за допомогою портативного пристрою, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (рис. 3). Пристрій працює шляхом вимірювання поверхневого потенціалу на затворі транзистора з використанням вимірювальної схеми з негативним зворотнім зв'язком, що

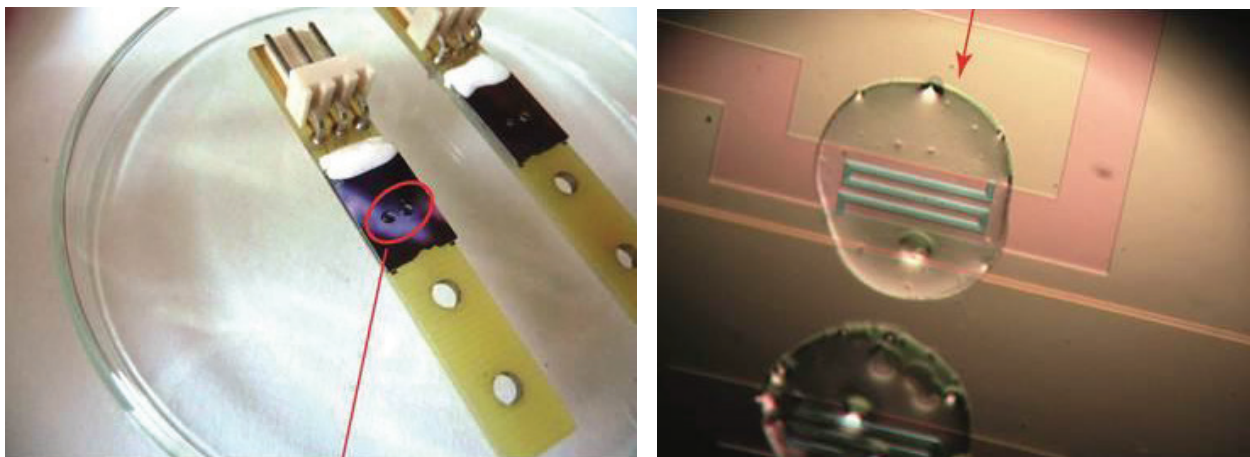


Рис. 2. Загальний вигляд потенціометричних перетворювачів та наближене зображення біоселективної та референтної мембран

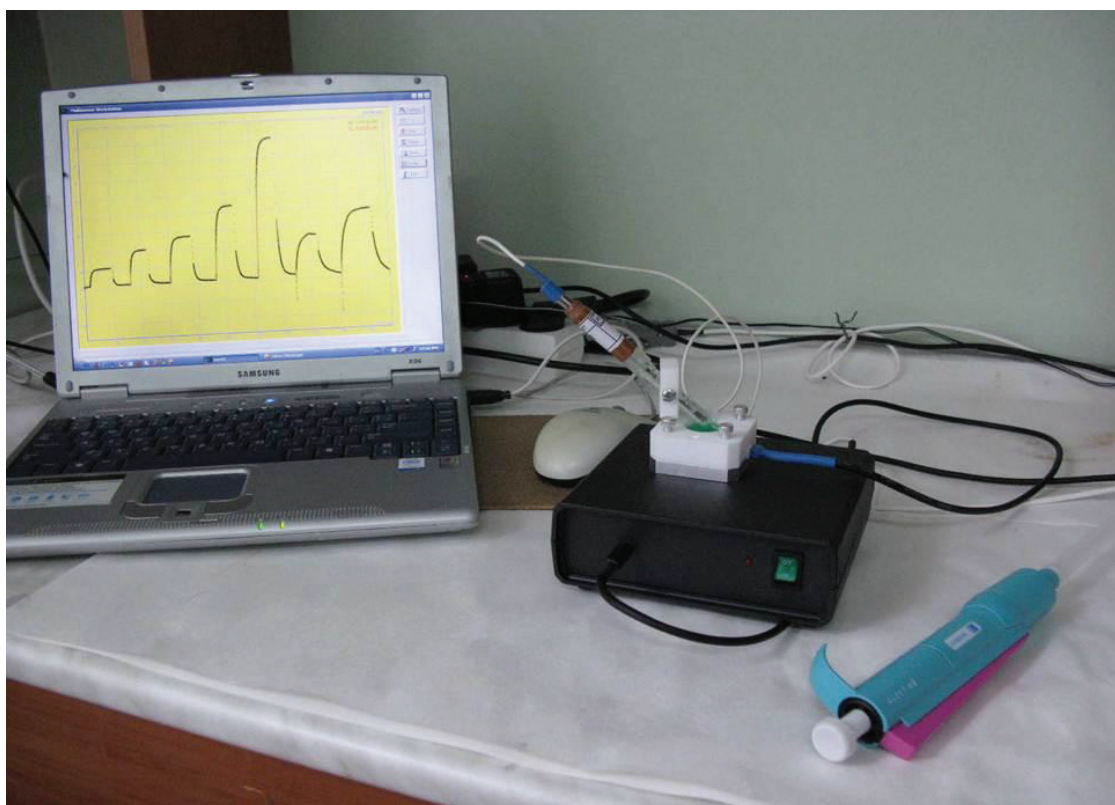


Рис. 3. Загальний вигляд портативного пристрою для вимірювань з потенціометричними біосенсорами

підтримує постійну величину струму в каналі польового транзистора 0,3 мА при постійній напрузі витік-стік близько 2 В. Вихідний сигнал відповідає потенціалу затвора. Пристрій дозволяє працювати в диференціальному режимі (із 10 або 100-кратним підсиленням сигналу), а також в режимі моніторингу (тобто,

вимірює різницю сигналів, отриманих з двох пар електродів або окремих сигналів від кожного з двох каналів). Інформація від датчиків імпортується в комп'ютер та обробляється за допомогою програмного забезпечення MSW_32 (Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України).

Виготовлення біоселективних мембран

Біоселективні мембрани були сформовані зшивкою ацетилхолінестерази з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні перетворювача в насичених парах глутарового альдегіду. Для виготовлення робочих біоселективних мембран використовували розчин: 1% ацетилхолінестерази, 1% БСА та 10% гліцерин у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,0. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість фермента брали тільки БСА з кінцевою концентрацією 2%. Після нанесення приготовлених розчинів на робочі поверхні перетворювачів, їх розміщували у насичених парах глутарового альдегіду на 20 хв., а потім витримували 10–15 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після цього біосенсиори відмивали у робочому буфері протягом 15 хв. (кожні 5 хв. змінювали буфер) від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани.

Потенціометричні вимірювання

Потенціометричні вимірювання проводили після розміщення перетворювачів у вимірювальній комірці, заповненої 5мМ фосфатним буфером, рН 7,0. Розчин постійно перемішували. Всі експерименти проводили в двох або трьох серіях повторів. Неспецифічні зміни в вихідному сигналі, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та іншими факторами були усунені за рахунок використання диференціального режиму вимірювання.

Для визначення рівня інгібування ферменту використовували наступну процедуру вимірювань: в експериментальну комірку спочатку вносили субстрат та вимірювали сигнал, який приймали за умовну одиницю (Z). Після стабілізації сигналу вносили певну кількість розчину інгібітора, та за величиною падіння сигналу (Z_i) оцінювали ефект інгібування. Рівень інгібування біоселективного елементу оцінювався як $(Z_i/Z) \times 100\%$ (рис. 4)

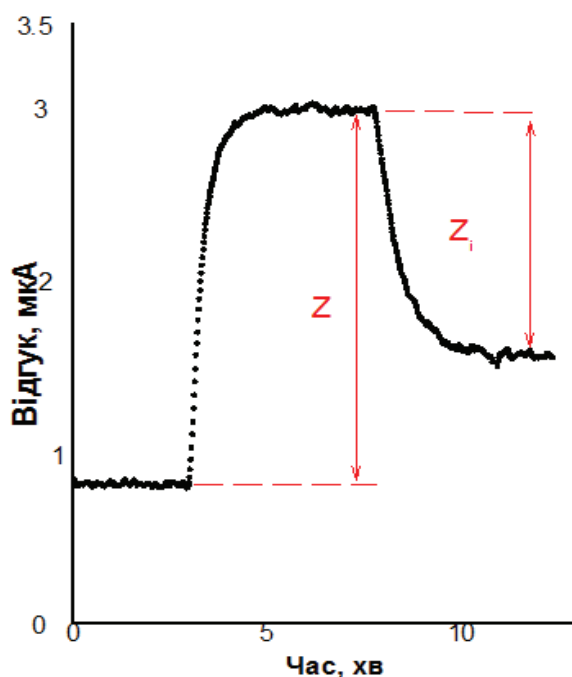


Рис. 4. Типова кінетична крива, що показує відгук сенсора на додавання субстрату та процес інгібування ферментного елементу біосенсора.

Вирощування культури тканин раувольфії зміїної

Матеріалом для дослідження була біомаса отриманого у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та культивованого в умовах

in vitro високопродуктивного штаму К-27 культури тканин раувольфії зміїної [8]. Штам вирощували в термостатованих умовах (27–28 °С) у темряві в скляних посудинах об'ємом 250 мл, що містили 50 мл спеціального живильного агаризованого середовища (рис. 5).



Рис. 5. Культура тканин *R. serpentina*

У результаті проведених досліджень методом ВЕРХ встановили, що у клітинній біомасі штаму К-27 раувольфії зміїної, культивованого

понад 30 років у стабільних умовах *in vitro*, накопичується 20 індолних алкалоїдів (рис. 6).

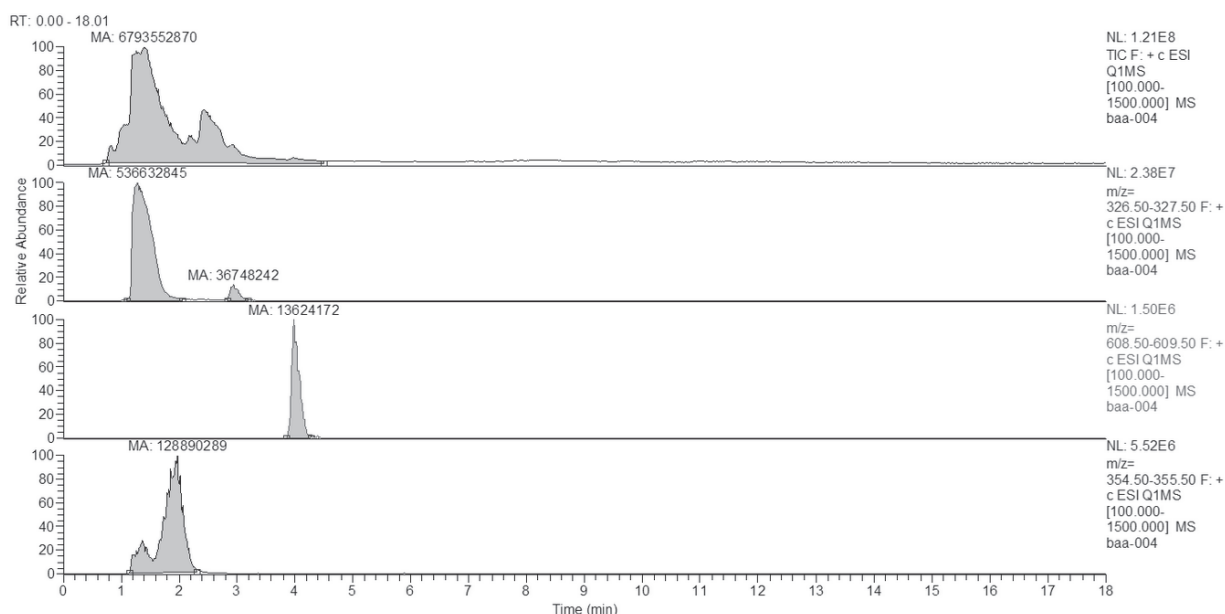


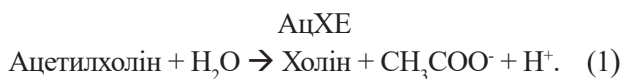
Рис. 6. Хроматограма алкалоїдів у клітинній біомасі штаму К-27 раувольфії зміїної:

- 1) хроматограма за повним іонним струмом;
- 2) хроматограма за іоном m/z 327 (іон $[M+H]^+$ аймаліну);
- 3) хроматограма за іоном m/z 609 (іон $[M+H]^+$ резерпіну);
- 4) хроматограма за іоном m/z 355 (іон $[M+H]^+$ йохімбіну) [Беда та ін., 2021]

Вміст індольних алкалоїдів протягом майже 30 років його культивування стабільний і є вищим порівняно з природною сировиною – коренями тропічних рослин раувольфії зміїної. Сумарний вміст алкалоїдів у перерахунку на суху біомасу культивованих клітин становив 2,8%, вміст аймаліну та аймаліноподібних алкалоїдів – 1,6% від сухої маси, а для природної сировини (корені 5–7-річних рослин) – 0,8–1,3% [Беда та ін., 2021].

Результати

В основі роботи біосенсора лежить ферментативна реакція, що відбувається в мембрані з ацетилхолінестеразою, нанесеній на поверхню перетворювача:



В процесі проходження ферментативної реакції ацетилхолінестераза розщеплює ацетилхолін на холін та оцтову кислоту. Оцтова

кислота, в свою чергу, дисоціює, тим самим збільшуючи локальну концентрацію протонів в робочій мембрані. Зміни рН в мембрані детектуються за допомогою датчика на основі ІСПТ, що призводить до збільшення сигналу біосенсора. Подальше додавання інгібіторів ацетилхолінестерази, наприклад, індольних алкалоїдів, у вимірювальну комірку призводить до зменшення числа протонів, що утворюються в результаті ферментативної реакції, і відгук біосенсора зменшується.

Перш за все були отримані калібрувальні криві на субстрат (АцХХ) двома методами – так званою «драбинкою», коли концентрація субстрату в комірці змінюється шляхом послідовного додавання певних аліквот стокового розчину без проміжного відмивання, а результат цих додавань підсумовується; а також більш точним методом з проміжним відмиванням між додаваннями різних концентрацій субстрату. За отриманими даними були побудовані залежності відгуку від різних концентрацій субстрату, які представлені на рис. 7.

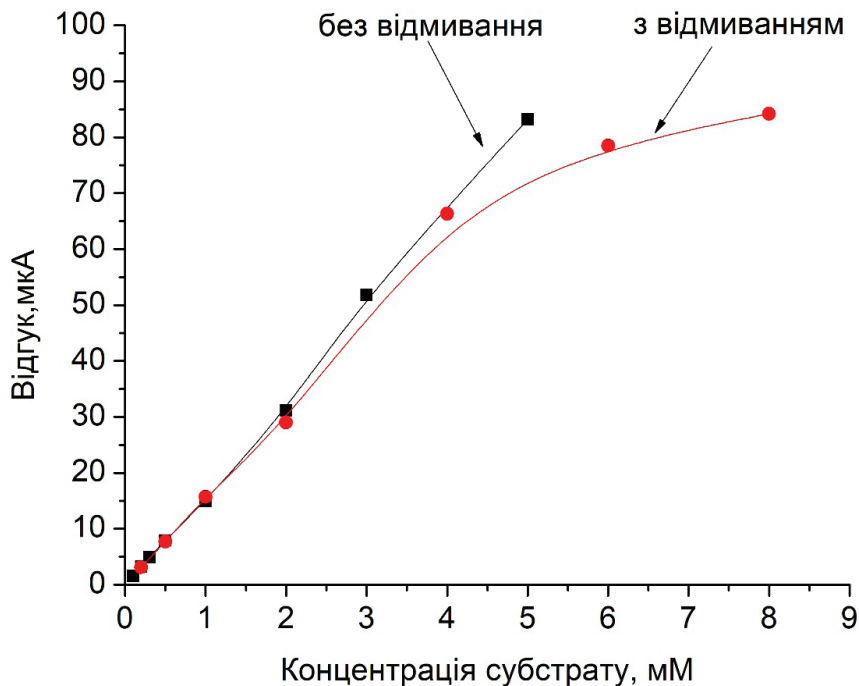


Рис. 7. Калібрувальні криві, отримані «драбинкою» та з відмиванням буферним розчином після кожного додавання субстрату

З рис. 7 видно, що калібрувальні криві, отримані двома методами, майже однакові в межах лінійного діапазону, тому для вимірювань можна застосовувати обидва методи. Однак, для попередніх досліджень зручніше використовувати метод «драбинкою», так як він дозволяє прискорити час експерименту.

На наступному етапі було визначено, оптимальну концентрацію субстрату АцХХ для інгібування соком раувольфії. В експериментальну комірку спочатку вносили

субстрат, чекали виходу сигналу на плато та вимірювали його величину. Після стабілізації в комірку вносили 50 мкл соку та за величиною падіння сигналу оцінювали ефект інгібування. Потім не відмиваючи вносили ще 50 мкл соку і знову оцінювали величину падіння сигналу, а відповідно рівень інгібування біоселективного елементу при додаванні 50 та 100 мкл досліджуваного зразка. За отриманими даними була побудована залежність рівня інгібування від концентрації субстрату (рис. 8).

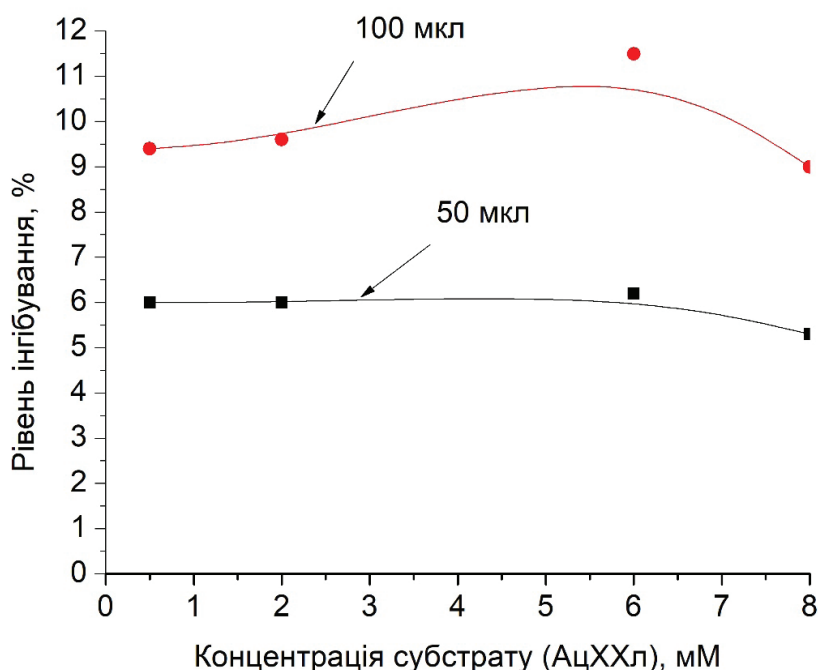


Рис. 8. Залежність рівня інгібування від концентрації субстрату АцХХ

Показано, що дещо більший рівень інгібування спостерігали при насичуючих концентраціях субстрату (4–6 мМ). Тому для подальшої роботи була обрана концентрація АцХХ 6 мМ.

Також визначено, що величина рівня інгібування не залежить від об'єму проби. Для цього було підготовлено кілька зразків різного об'єму, але з рівним змістом досліджуваного соку раувольфії. Різниці між рівнем

інгібування чистим соком культури тканин раувольфії та зразком, розбавленим буферним розчином, практично не було, тобто основний внесок у величину інгібування вносить саме досліджуваний зразок, а об'ємна похибка додавання є незначною.

На рис. 9. продемонстровано відгуки біосенсора на основі рН-ПТ на додавання субстрату та соку культури тканин раувольфії змінної на реальному прикладі проведення експерименту,

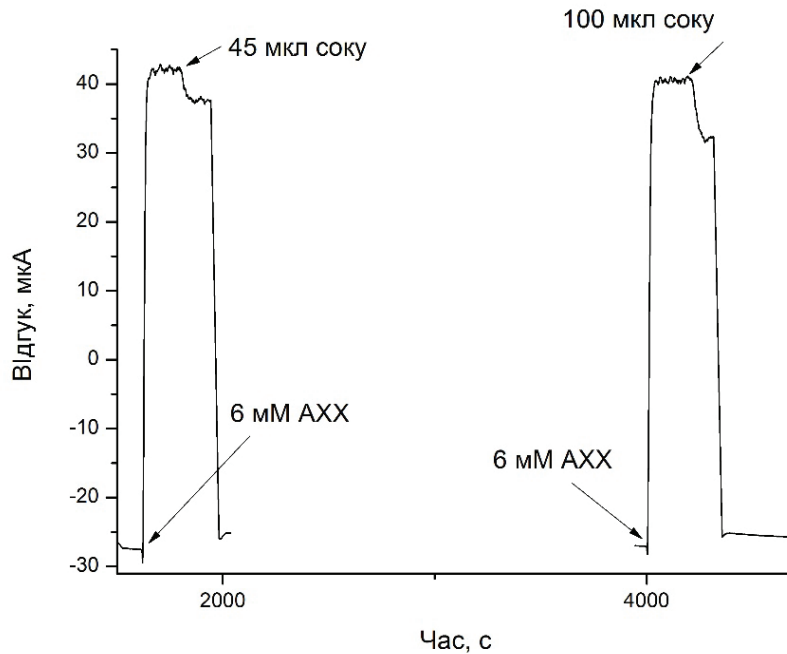


Рис. 9. Відгуки біосенсора на додавання 6 мМ АцХХ та різних об'ємів соку культури тканин раувольфії зміїної

На рис. 10. наведено залежність рівня інгібування ацетилхолінестерази, іммобілізованої на поверхні рН-чутливого польового транзистора, від сумарного вмісту індольних алкалоїдів, яка міститься в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної.

Біосенсор характеризувався високою чутливістю до сумарного вмісту індольних алкалоїдів (мінімальна межа визначення – 0,5 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів, які знаходяться в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної). Лінійний

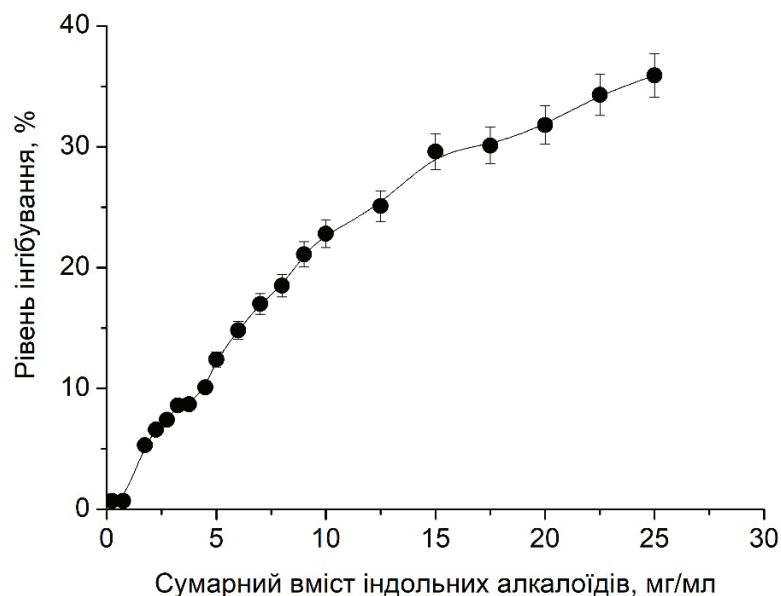


Рис. 10. Залежність рівня інгібування біосенсора на основі АцХЕ від сумарного вмісту індольних алкалоїдів, які знаходяться в соці, отриманому із культури тканин *R. serpentina*

діапазон біосенсорного визначення аналіту був від 2 до 15 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів.

Таким чином, створено лабораторний прототип біосенсора на основі ацетилхолінерастери для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів у культурі тканин раувольфії зміїної, який в подальшому може бути використаний для контролю цих біологічно активних речовин у сучасних біотехнологічних і фармацевтичних процесах виробництва ліків. Слід зазначити, що аналіз простий у використанні, швидкий, не потребує дороговартісного обладнання та спеціальної підготовки проб для його проведення на відміну від традиційних методів.

Подяка

Роботу проведено за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» та в рамках НДР «Розробка клітинних технологій виробництва біологічно активних сполук рослинного походження для фармакологічної та харчової промисловості» », № держреєстрації 0120U103216.

Список використаної літератури

[1]. Poonam, Agrawal S., Mishra, S. (2013). Physiological, biochemical and modern biotechnological approach to improvement of *Rauwolfia serpentina*. *IOSR-Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 6(2), 73–78. <https://doi.org/10.9790/3008-0627378>

[2]. Lobay D. (2015). *Rauwolfia* in the Treatment of Hypertension. *Integrative medicine*, 14(3), 40–46.

[3]. Singh, M., Kaur, R., Rajput, R., & Mathur, G. (2017). Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina*. *International Journal of Green Pha*

[4]. Bindu, S., Rameshkumar, K. B., Kumar, B., Singh, A., & Anilkumar, C. (2014).

Distribution of reserpine in *rauwolfia* species from India – HPTLC and LC–MS studies. *Industrial Crops and Products*, 62, 430–436. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.018>

[5]. Kumaria, R., Rathi, B., Rani, A., & Bhatnagar, S. (2013). *Rauwolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: phytochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23(2), 348–355.

[6]. Shamon, S. D., & Perez, M. I. (2016). Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews*, 12(12), CD007655. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007655.pub3>

[7]. Kunakh, V. A. (2005). *Biotehnologhiia likarskykh roslyn. Henetychni ta fiziologichno-biokhimichni osnovy* [Biotechnology of medician plants. Genetic, physiological and biochemical basis]. Kyiv: Logos. [in Ukrainian].

[8]. Kunakh V.A. Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independed *Rauwolfia serpentina* cell lines. *Euromedica-Hannover-2005* (16–17 Juni) International Congress and Exhibition: Programm Abstracts Hannover, 2005. P. 22.

[9]. Biotechnological interventions on the genus *Rauwolfia*: recent trends and imminent prospects / E. Mukherjee, S. Gantait, S. Kundu et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 103, Iss. 18. P. 7325–7354. <http://doi.org/10.1007/s00253-019-10035-6>

[10]. Panwar G.S., Guru S.K. Alkaloid profiling and estimation of reserpine in *Rauwolfia serpentina* plant by TLC, HP-TLC and HPLC. // *Asian Journal of Plant Science*. – 2011. – 10 (8). – P. 393–400.

[11]. Srivastava, A., Tripathi, A. K., Pandey, R., Verma, R. K., Gupta M.M. (2006). Quantitative determination of reserpine, ajmaline and ajmalicine in *Rauwolfia serpentina* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 44(9), 557–560. <http://doi.org/10.1093/chromsci/44.9.557>

[12]. Tarkowská D. (2020). A Fast and Reliable UHPLC–MS/MS-Based Method for Screening Selected Pharmacologically Significant Natural Plant Indole Alkaloids. *Molecules*, 25(14), 3274. <https://doi.org/10.3390/molecules25143274>

[13]. Bieda O. A., Konvalyuk I. I., Mozhylevska L. P., Lukashov S. S., Kunakh V. A.,

Yarmoluk S. M. Determination of content of indole alkaloids in cell biomass of *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz tissue culture. *Aktual'ni pytannia farmatsevychnoi ta medychnoi nauky ta praktyky*. 2021(1), p.73–78. doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226810.

Стаття надійшла до редакції 10.08.2021 р.

UDC543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.3.241060

DEVELOPMENT OF AN ENZYME BIOSENSOR BASED ON pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR ESTIMATING THE TOTAL CONTENT OF INDOLE ALKALOIDS IN TISSUE CULTURE OF *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. EX KURZ

V. M. Arkhypova¹, O. O. Soldatkin¹, L. P. Mozhylevska¹, I. I. Konvalyuk¹, V. A. Kunakh¹, S. V. Dzyadevych^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotnogo Street 150, 03680 Kyiv, Ukraine;

²Institute of High Technologies of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 4G Glushkova Av., 03022 Kyiv, Ukraine.

e-mails: avalka@yahoo.com, alex_sold@yahoo.com, l.mozhylevska@gmail.com, konvalyuk.i.i@gmail.com, kunakh@imbg.org.ua, dzyad@yahoo.com

Summary

Today, much attention in medical practice is paid to indole alkaloids, which have significant physiological activity. An urgent issue is the development of methods to control the presence of the total content of indole alkaloids in the cellular biomass of *Rauwolfia serpentina* with a view to its further use for pharmaceutical purposes.

The aim of the work was to develop an enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors to estimate the total content of indole alkaloids in tissue culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz.

Research methods: The potentiometric method of analysis with differential measurement mode was used in the work. pH-sensitive field-effect transistors were used as transducer. Acetylcholinesterase was used in the fabrication of the bioselective membrane of the biosensor, which was immobilized by covalent crosslinking with glutaraldehyde with bovine serum albumin on the surface of the transducers.

Results: The created biosensor was characterized by high sensitivity to the total content of indole alkaloids (minimum limit of determination – 0.5 µg/ml of the total content of indole alkaloids, which is in the juice obtained from tissue culture of *Rauwolfia serpentina*). The linear range of biosensor determination of the analyte was from 2 to 15 µg/ml of the total content of indole alkaloids.

Conclusions: Analysis of indole alkaloids using a biosensor is simple and fast and does not require expensive equipment and special sample preparation for analysis, unlike traditional methods.

The created biosensor can be further used to control the total content of indole alkaloids in modern biotechnological and pharmaceutical processes for the production of drugs and biologically active additives.

Keywords: acetylcholinesterase, biosensor, pH-sensitive field-effect transistor, indole alkaloids, *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz, llant tissue culture

УДК 543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.3.241060

РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ СУМАРНОГО ВМІСТУ ІНДОЛЬНИХ АЛКАЛОЇДІВ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ (*Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz)

В. М. Архипова¹, О. О. Солдаткін¹, Л. П. Можилевська¹,
І. І. Конвалюк¹, В. А. Кунах¹, С. В. Дзядевич^{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

e-mail авторів: avalka@yahoo.com, alex_sold@yahoo.com, l.mozhylevska@gmail.com,
konvalyuk.i.i@gmail.com, kunakh@imbg.org.ua, dzyad@yahoo.com

Реферат

На сьогодні велика увага в медичній практиці приділяється індольним алкалоїдам, які володіють помітною фізіологічною активністю. Актуальним питанням є розробка методів контролю наявності сумарного вмісту індольних алкалоїдів у клітинній біомасі *Rauwolfia serpentina* з метою подальшого її використання у фармацевтичних цілях.

Мета роботи полягала в розробці ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz).

Методи дослідження: В роботі застосовували потенціометричний метод аналізу з диференційним режимом вимірювання. Як датчики використовувались рН-чутливих польових транзисторів. При виготовленні біоселективної мембрани біосенсора використовували ацетилхолінестеразу, яка була іммобілізована ковалентною зшивкою плутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхню перетіорювача.

Результати дослідження: Створений біосенсор характеризувався високою чутливістю до загального вмісту індольних алкалоїдів (мінімальна межа визначення – 0,5 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів, які знаходиться в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналіту був від 2 до 15 мкг/мл сумарного вмісту індольних алкалоїдів.

Висновки: Аналіз індольних алкалоїдів за допомогою біосенсора є простим та швидким та не потребує дороговартісного обладнання та спеціальної підготовки проб для проведення аналізу на відміну від традиційних методів. Створений біосенсор в подальшому може використовуватись для контролю сумарного вмісту індольних алкалоїдів у сучасних біотехнологічних і фармацевтичних процесах виробництва ліків та біологічно активних добавок.

Ключові слова: ацетилхолінестераза, біосенсор, рН-чутливий польовий транзистор, індольні алкалоїди, *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz., культура тканин рослин