

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 643.554, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312688>

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ

*В. М. Архипова¹, І. С. Книр^{1,2}, В. А. Бахмат^{1,2}, Ю. В. Карпенко¹,
О. О. Солдаткін¹, С. В. Дзядевич^{1,2}*

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

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ, Україна, 01033, dzyad@yahoo.com

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ

В. М. Архипова, І. С. Книр, В. А. Бахмат, Ю. В. Карпенко, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В роботі досліджено основні аналітичні характеристики потенціометричного біосенсора на основі креатиніндеімінази при роботі з модельними зразками та проведено їхнє порівняння для різних методів іммобілізації фермента. Виявлено, що всі сенсори характеризуються подібним діапазоном роботи, часом відгуку та високою операційною стабільністю. В той же час, чутливість біосенсора до креатиніну була в 2 разів вища для варіанту іммобілізації в краплі глутарового альдегіду. Стабільність при зберіганні була високою для всіх методів іммобілізації, за виключенням іммобілізації в парах глутарового альдегіду, коли величина відгуку сенсора впала на 50% за 100 днів зберігання. Залежності від умов проведення експериментів були типовими для ферментних біосенсорів та не залежали від методу іммобілізації фермента. Лінійний діапазон визначення креатиніну є цілком придатним для подальшої роботи з реальними зразками крові та діалізної рідини при їхньому розведенні в 10 разів.

Ключові слова: іон-селективний польовий транзистор, біосенсор, креатиніндеіміназа, аналіз креатиніну, іммобілізація

© В. М. Архипова, І. С. Книр, В. А. Бахмат,
Ю. В. Карпенко, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич, 2024

COMPARISON OF CREATININE DEIMINASE IMMOBILIZATION METHODS FOR DESIGN OF POTENTIOMETRIC BIOSENSORS FOR CREATININE DETECTION

V. M. Arkhypova, I. S. Knyr, V. A. Bakhmat, Y. V. Karpenko, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. The main analytical characteristics of the potentiometric biosensor based on creatinine deiminase were investigated when working with model samples, and comparison for various enzyme immobilization methods was made. It was found that all sensors are characterized by a similar operating range, response time and high operational stability. At the same time, the sensitivity of the biosensor to creatinine was 2 times higher for the option of immobilization in a drop of glutaraldehyde. Storage stability was high for all immobilization methods, with the exception of immobilization in glutaraldehyde vapors, when the value of the sensor response dropped by 50% after 100 days of storage. The dependences on the experimental conditions were typical for enzyme biosensors and did not depend on the enzyme immobilization method. The linear range of creatinine determination is quite suitable for further work with real blood samples and dialysis fluid when diluted 10 times.

Keywords: ion-selective field-effect transistor, biosensor, creatinine deiminase, creatinine analysis, immobilization

Вступ

Аналітична біотехнологія як важлива частина сучасної біотехнології передбачає використання біологічних об'єктів (тканин, клітин і органел), мультимолекулярних комплексів, біомолекул або навіть цілих живих систем для аналітичних цілей. Актуальність аналітичної біотехнології для клінічної медицини пов'язана з розробкою селективних, чутливих і недорогих методів визначення практично важливих аналітів – біомаркерів найпоширеніших хвороб. Одним із успішних прикладів аналітичної біотехнології є біосенсорні системи, що мають низку переваг у порівнянні із традиційними методами аналізу [1].

Креатинін є кінцевим продуктом розпаду білків в організмі тварин і людей. Він утворюється у великих кількостях у м'язах у результаті гідролізу креатинфосфату з виділенням енергії, а також в ході спонтанного перетворення креатину в креатинін, та виділяється в кров. Кількість креатиніну в сироватці крові є важливим показником функції нирок, тому що це легко вимірний побічний продукт м'язового метаболізму, який виводиться нирками в незміненому вигляді, головним чином, шляхом клубочкової фільтрації [2]. Підвищена концентрація креатиніну в сироватці крові свідчить про серйозну ниркову недо-

статність [3]. Гіперкреатинінемія пов'язана з хронічними або гострими захворюваннями нирок, ускладненнями діабетичної нефропатії [4] або COVID-19 [5], а також ураженням нирок токсичними факторами, зокрема, певними ліками, рентгеноконтрастними речовинами, антибіотиками, наприклад аміноглікозидами, цефалоспоридами, статинами тощо [6, 7]. Креатинін вважається важливим показником фізіологічного стану спортсменів [8], і існує необхідність у простих методах визначення цього метаболіту в біологічних рідинах, у тому числі в потовиділенні.

Для аналізу оцінки стану пацієнтів широко використовується ряд хімічних методів визначення креатиніну, що мають обмеження через недостатню чутливість і низьку специфічність [9]. Також використовуються різноманітні прогресивні інструментальні методи визначення креатиніну, а саме високоефективна рідинна хроматографія [10], іонна хроматографія [11], міцелярна електрокінетична хроматографія [12], капілярний зонний електрофорез [13], тандемна мас-спектрометрія [14] тощо. Однак всі ці методи є досить складними, трудоземними, дорогавартісними та непридатними для аналізу креатиніну у режимі реального часу. Тому розробка біосенсорних експрес-методів для аналізу креатиніну викликає високу

зацікавленість. На даний час описано низку біосенсорів, які засновані, головним чином, на використанні ферменту креатиніндеімінази як біокаталітичного елемента біосенсорів [15–17]. Незважаючи на численні переваги розроблених біосенсорів, вони мають ряд недоліків, які притаманні взагалі всім біосенсорним системам без прив'язки до конкретного застосування. Це обмежена стабільність чутливого елемента, висока ціна ферментів, відносно короткий лінійний діапазон калібрувальної кривої та високий фоновий струм тощо. Все це обмежує широке використання біосенсорів на практиці.

Також дуже важливим питанням розробки є вибір методу іммобілізації фермента та відтворюваність робочих характеристик біосенсорів після різних серій іммобілізації біологічного матеріалу. Навіть при автоматизованій процедурі іммобілізації ферментів кожна серія біосенсорів може дещо відрізнитися за аналітичними характеристиками, що є неприпустимим при налагодженні промислового випуску біосенсорних приладів. Це обумовлюється, перш за все, неможливістю контролювати біологічну активність матеріалу, що виконує роль біоселективного елемента сенсора (з одного боку може змінюватись вихідна активність ферменту, з іншого боку, відбувається її втрата в процесі іммобілізації та під час експлуатації та зберіганні готового сенсора).

У потенціометричному методі детекції вимірюється потенціал на поверхні перетворювача всередині мембрани, який змінюється під час ферментативної реакції. Потенціометричні біосенсори на основі рН-чутливих польових транзисторів є перспективними з огляду на використання групових технологій мікроелектроніки, які є найкращим засобом зниження собівартості окремого приладу при налагодженні їхнього масового виробництва.

В роботі представлено порівняння аналітичних характеристик потенціометричних біосенсорів на основі креатиніндеімінази для різних методів іммобілізації фермента.

Матеріали і методи

Матеріали

Для створення біосенсора був використаний мікробний фермент креатиніндеіміназа (КД), отриманий із *Streptomyces sp.*, ліофільно висушений, з активністю 19 од. акт. мг⁻¹ (Sigma-Aldrich). Сироватковий альбумін бика (БСА), креатинін та 25 % водний розчин гліцерину був також фірми Sigma-Aldrich (США). Фотополімер полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин (PVA/SbQ), був фірми Toyo Gosei Kogyo Co.Ltd (Японія). 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) був фірми Serva (Німеччина). Як робочі буферні розчини використовували КН₂РО₄-NaН₂РО₄ фірми Merck (Німеччина).

Для приготування буфера «Полімікс» використовували реактиви фірми Merck (Німеччина) та солі вітчизняного виробництва. Буфер «Полімікс» має стабільну буферну здатність у широкому діапазоні рН від 5 до 9. Готували його за таким складом: 2,5 мМ Трис, 2,5 мМ КН₂РО₄, 2,5 мМ лимонної кислоти, 2,5 мМ тетраборату натрію, 150 мМ NaCl. рН цього буфера регулювали титруванням або NaOH, або HCl.

Для визначення рН-чутливості перетворювачів використовували стандартні рН-калібрувальні розчини вітчизняного виробництва. Усі інші реактиви, як вітчизняного так і імпорного виробництва, були кваліфікації «ос.ч» і «х.ч».

Потенціометричні датчики та вимірювальна система

В роботі використовували сенсорні чипи з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів. Розроблена топологія передбачала розміщення двох ідентичних р-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм² (ефективна площа для нанесення чутливих шарів складає біля 12,5 мм²). Кристалічний чип з диференційною рН-ПТ-парою монтувався на спеціальній друкованій платі, його контактні площини з'єднувались з платою тонкими дротами та ізолювались герметичним компаундом (рис. 1).

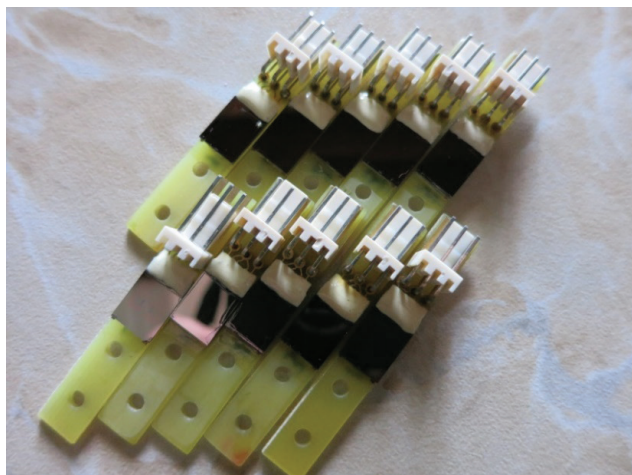


Рис. 1. Загальний вигляд біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів.

Для виготовлення рН-ПТ-структур використовувались стандартні операції кремнієвої МОН-технології з формуванням підзатворного діелектричного шару із термічно окисленої плівки SiO_2 товщиною 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 товщиною 50-70 нм. В якості підкладки використовувались кремнієві пластини *n*-типу. Зигзагоподібна геометрія затворної області транзистора з відношенням довжини каналу до його ширини рівним 100, забезпечувала достатньо високий коефіцієнт підсилення *p*-канальних транзисторів. Протон-селективні властивості транзисторів обумовлені рН-чутливим діелектричним шаром Si_3N_4 . Величина рН-чутливості сенсорних елементів становила біля 40-45 мВ/рН, що при наявній крутизні перехідної вольт-амперної характеристики транзистора в межах 400-500 мкА/В забезпечувало рН-чутливість струму каналу порядку 16-23 мкА/рН. Вимірювання відгуку рН-ПТ відбувалося за допомогою схеми прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. Порогова напруга для рН-ПТ була близько -2,5 В. Вимірювання проводились за умов: струм каналу близько 500 мкА, напруга стік-витік близько 2 В, підкладка з'єднана зі стоком [18].

Імобілізація креатиніндаїмінази

Для отримання біоселективних матриць використовували наступні методи імобілізації креатиніндаїмінази.

Імобілізація в фотополімері PVA/SbQ **Варіант 1.**

Для отримання біоселективних матриць готувались робочі розчини на основі суміші КД:БСА:фотополімер PVA/SbQ (для чутливої біоселективної мембрани) та БСА:фотополімер PVA/SbQ (для референтної мембрани), які потім наносились на чутливі ділянки потенціометричного датчика.

Біологічно активну мембрану на основі креатиніндаїмінази формували шляхом фотополімеризації в PVA/SbQ. Для цього готували 10 % розчин PVA/SbQ в дистильованій воді, який нагрівали до 70-80 °С. Далі змішували розчин 10% креатиніндаїмінази із наважкою БСА 10% по масі і додаванням 10% гліцерину (суміш для біоселективної мембрани). Окремо готували 10 % розчин БСА з додаванням 10% гліцерину для референтної мембрани. Суміш для біоселективної мембрани і PVA/SbQ у співвідношенні 1:1 по об'єму ретельно перемішували для отримання гомогенного розчину. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість суміші для біоселективної мембрани брали лише БСА. Отримані розчини об'ємом 0,1 – 0,2 мкл наносили на робочі поверхні рН-ПТ. Сенсорний датчик з нанесеними мембранами розміщували в камері опромінювальної системи Bio-Link BLX-365 з наступними параметрами: доза 20 Дж/м², довжина ультрафіолетової хвилі 365 нм, тривалість експозиції – від 10 до 20 хв.

Варіант 2.

Для отримання біоселективних матриць готувались робочі розчини на основі суміші КД:БСА:фотополімер PVA/SbQ (для чутливої біоселективної мембрани) та БСА:фотополімер PVA/SbQ (для референтної мембрани), які одразу змішувались у співвідношенні 1:1 по об'єму, ретельно перемішувались потім наносились на чутливі ділянки потенціометричного датчика. Далі готові, змішані з PVA/SbQ розчини зберігалися при температурі -20°С, при кожній наступній імобілізації розморожувались, наносились на відповідні ділянки датчиків, розміщувались в камері опромінювальної системи Bio-Link BLX-365 з наступними параметрами: доза 20 Дж/м², довжина ультрафіоле-

тової хвилі 365 нм, тривалість експозиції – від 10 до 20 хв.

Імобілізація в парах глутарового альдегіду

Для створення біоселективної мембрани готували розчин фермента (5 % креатиніндеімінази + 5% БСА) в 20 мМ фосфатному, рН 7,2 з додаванням гліцерину до кінцевої концентрації 10 %. Для створення референтної мембрани готували 10 % БСА в тому ж самому буферному розчині. Гліцерин до кінцевої концентрації 10 % додавався для стабілізації ферменту при іммобілізації та для запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Краплю суміші фермент-БСА наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача, на іншу – 10 % розчин БСА без фермента. Для полімеризації мембран датчики розміщували в ексикаторі в атмосфері насичених парів ГА на 20-30 хв і потім підсушували на повітрі.

Імобілізація в краплі глутарового альдегіду

Для створення біологічно активної мембрани готували розчин ферменту (10 % креатиніндеімінази + 10% БСА) в 20 мМ фосфатному, рН 7,2 з додаванням гліцерину до кінцевої концентрації 10 %. Для створення референтної мембрани готували 20 % БСА в тому ж самому буферному розчині. Краплю суміші фермент-БСА змішували з 1% розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1 по об'єму, ретельно перемішували і наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача в об'ємі 0,1-0,2 мкл. Таким же чином наносили суміш для референтної мембрани на другу частину перетворювача. Після нанесення розчинів датчики залишали на повітрі на 25-30 хвилин для полімеризації мембран.

Типовий зовнішній вигляд мембрани наведений на рис. 2.

Методика вимірювань

Всі вимірювання проводили при денному світлі за кімнатної температури у відкри-

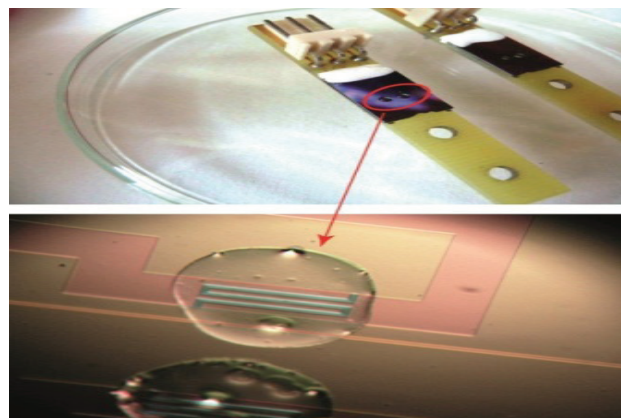


Рис. 2. Мікрозображення мембран.

тій комірці об'ємом 2-3 мл при постійному перемішуванні. Перед використанням біосенсори 20-30 хв витримували в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,2, для отримання стабільного базового сигналу. Концентрацію креатиніну змінювали, додаючи певні аліквоти його вихідного концентрованого розчину. Після отримання кожного відгуку біосенсори відмивали від продуктів реакції, змінюючи робочий буферний розчин мінімум 3 рази до повернення сигналу на базову лінію. Дослідження проводилися щонайменше у двох – трьох повторах. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричними наводками, були значно зменшені завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

Результати і обговорення

Принцип роботи біосенсора для визначення креатиніну базується на наступній ферментативній реакції:

КД



В ході реакції гідролізу креатиніну відбувається збільшення рН в ферментній мембрані, що і реєструється рН-чутливим польовим транзистором. Це збільшення рН прямо пропорційне концентрації креатиніну в розчині (рис. 3).

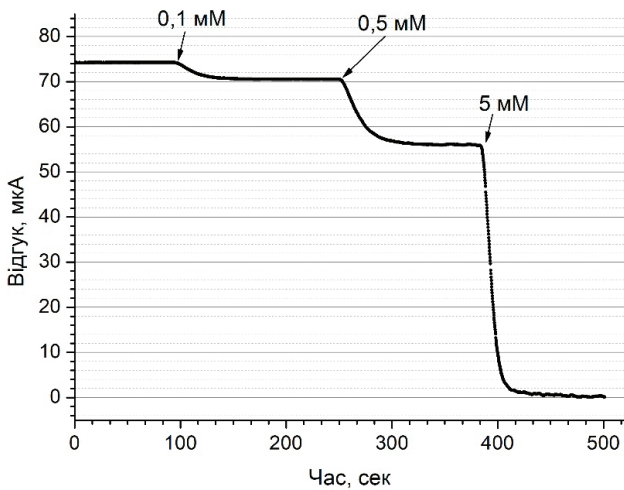


Рис. 3. Експериментальні відгуки потенціометричного біосенсора на основі креатиніндеімінази на додавання різних концентрацій креатиніну. Вимірювання проводили в 5 мМ калій- фосфатному буфері, рН 7,2.

Для створення біоселективного елементу біосенсора на основі КД було використано різні методи іммобілізації ферменту: 1) ковалентне зв'язування молекул фермента з молекулами

БСА глутаровим альдегідом (іммобілізація в насичених парах та краплі ГА) та 2) захват фермента в фотополімер PVA/SbQ (два різні варіанти).

Глутаровий альдегід – це біфункціональний агент, що містить дві альдегідні групи на обох кінцях ланцюга, які при нейтральних значеннях рН можуть реагувати з вільними аміногрупами фермента та/чи іншого білка (рис. 4). В цьому випадку дві альдегідні групи ГА реагують з аміногрупами фермента та білка носія, зшиваючи їх між собою і утворюючи таким чином біоселективну мембрану. Ці зв'язки стійкі до різких змін рН та температури. Завдяки такій обробці фермент стає стабільнішим, однак недоліком даного процесу є деяке зниження активності ферменту та токсичність глутарового альдегіду.

PVA/SbQ (полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин) – це розчинний фотополімер, який під впливом ультрафіолетового світла полімеризується та утворює сітку, в яку захоплюються молекули фермента чи БСА [19] (рис.5).

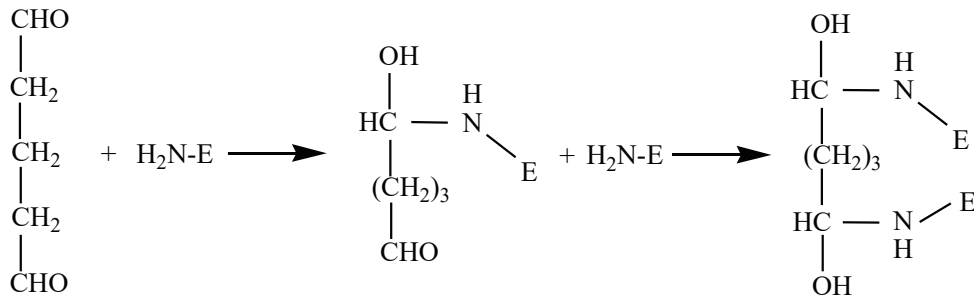


Рис. 4. Реакція ковалентного зв'язування за допомогою глутарового альдегіду.

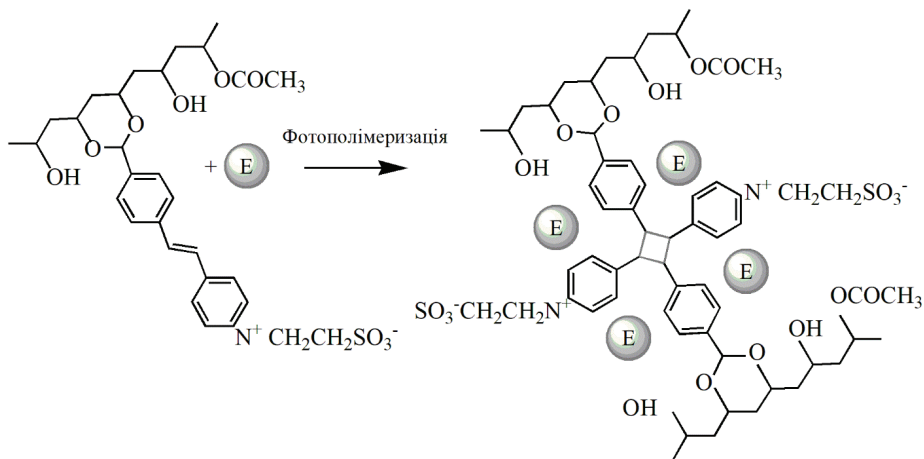


Рис. 5. Реакція фотополімеризації із захватом фермента.

На рис.6 наведено типові калібрувальні криві для різних методів іммобілізації КД.

Як видно з рис.6 лінійний діапазон визначення креатиніну біосенсором на основі різних методів іммобілізації КД був приблизно однаковим (в межах від 0,08 до 3 мМ креатиніну). В той же час чутливість біосенсора до креатиніну була в 2 рази вища для варіанту іммобілізації в краплі ГА ніж в парах ГА, та в 1,5 рази вища за іммобілізацію в фотополімері. Час відгуку при цьому був практично однаковим для всіх варіантів іммобілізації і складав від 1 до 3 хвилин в залежності від концентрації субстрата.

Відомо, що кожен фермент має як робочий діапазон рН, так і його оптимум функціонування. З літератури відомо, що вільна КД мікробіального походження найефективніше працює в оптимальних значеннях рН, які складають 7 – 7,5 [20-21]. Проте, для подальшої роботи необхідно знати, яким саме оптимумом рН буде характеризуватися фермент в іммобілізованому стані, оскільки процес іммобілізації може привести до суттєвих змін цих залежностей (рис. 7).

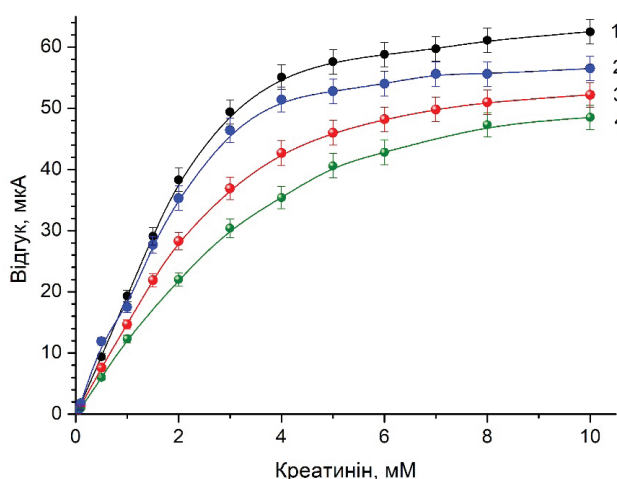


Рис. 6. Калібрувальні криві для визначення креатиніну для різних методів іммобілізації креатиніндеїмінази (1 – ковалентне зшивання в краплі ГА, 2 - захват в фотополімері PVA/SbQ методом 1, 3 - захват в фотополімері PVA/SbQ методом 2, 4 – ковалентне зшивання в парах ГА). Вимірювання проводили в 5 мМ калій- фосфатному буфері, рН 7,2.

Як видно з рис. 7, діапазон рН і рН-оптимум для іммобілізованої в фотополімері КД збігається з відповідними параметрами вільного ферменту, що свідчить про відсутність суттєвої модифікації просторової структури КД під час іммобілізації. В той же час, у випадку іммобілізації в ГА, оптимум рН зсувався до рН 6,3. Але обидва методи іммобілізації можуть бути використані для створення біоселективних елементів на основі КД.

Важливим параметром для вимірювань є також вплив на величину відгука буферної ємності та іонної сили робочого розчину. Було досліджено вплив різних концентрацій буферного розчину на відгуки біосенсора для різних методів іммобілізації (рис. 8). З рисунку видно, що збільшення концентрації фосфатного буфера від 2 до 20 мМ спричиняє зменшення вихідного сигналу в 1,5 – 2 рази для всіх варіантів іммобілізації. Ця ситуація є звичайною для потенціометричних сенсорів і може бути пояснена асоціацією протонів або гідроксид-іонів з дисоційованими частинками буферу. Таким чином, чим вищою є концентрація робочого буфера і його буферна ємність, тим менший

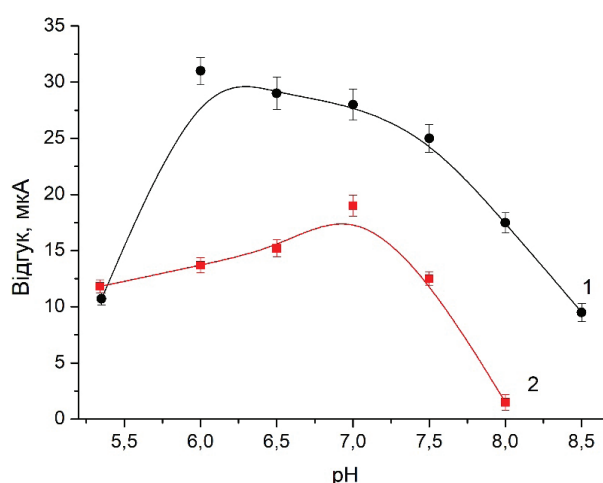


Рис. 7. Залежність відгуку біосенсора на основі КД, іммобілізованої різними методами (1 – ковалентне зшивання в краплі ГА, 2 – захват в фотополімері PVA/SbQ). Вимірювання проводили в 5 мМ полімікс буфері із 40 мМ NaCl за кімнатної температури, концентрація креатиніну – 5 мМ.

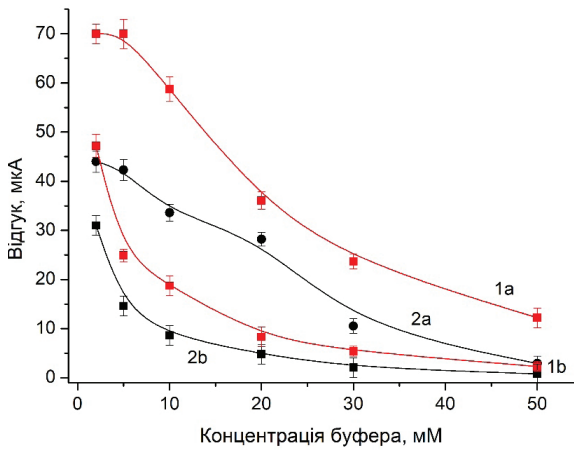


Рис. 8. Залежність відгуку біосенсора на основі КД, іммобілізованої різними методами (1 – ковалентне зшивання в краплі ГА, 2 – захват в фотополімері PVA/SbQ) від буферної ємності робочого розчину. Вимірювання проводили в фосфатному буферному розчині, рН 7,2 за кімнатної температури, концентрація креатиніну – 5 мМ (а) та 1 мМ (б).

зсув рН, а відповідно – менший відгук біосенсора і чутливість біосенсорного визначення.

Необхідно зазначити, що при зміні концентрації буферного розчину змінюється не лише буферна ємність, а й іонна сила розчину. Щоб перевірити, що саме є причиною зменшення відгуків біосенсора при зміні концентрації буфера (зміна іонної сили чи буферної ємності), було проведено вимірювання величини відгуку біосенсора на внесення креатиніну залежно від концентрації NaCl в розчині, тобто лише від зміни іонної сили робочого буфера (концентрація NaCl змінювалась від 2 до 100 мМ) (рис. 9).

З рисунку видно, що збільшення концентрації NaCl незначно впливає на величину відгуку біосенсора, тобто основним чинником впливу на відгук біосенсора на креатинін є саме буферна ємність розчину. Подібні результати були отримані і для інших методів іммобілізації креатиніндеїмінази, і виявлену закономірність необхідно враховувати при роботі з реальними зразками.

Важливими аналітичними характеристиками будь-якого біосенсора є відтворюваність його відгуків та стабільність при зберіганні

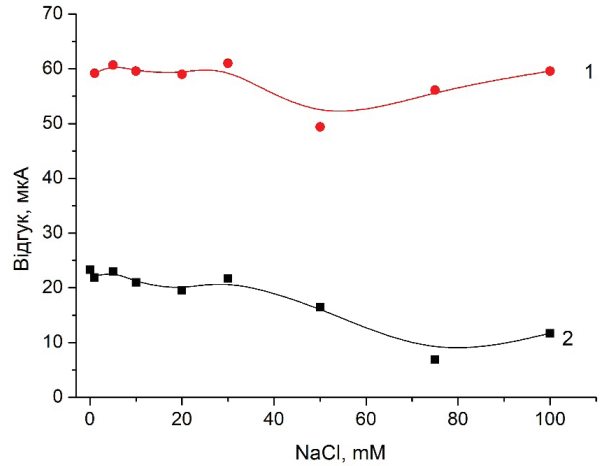


Рис. 9. Залежність відгуку біосенсора на основі КД, іммобілізованої захватом в фотополімері PVA/SbQ, від концентрації NaCl, доданої до 5 мМ фосфатного буфера, рН 7,2. Вимірювання проводили за кімнатної температури, концентрація креатиніну – 5 мМ (1) та 1 мМ (2).

сенсора. Щоб дослідити першу робочу характеристику, ми протягом одного робочого дня отримували відгуки біосенсора на одну й ту ж саму концентрацію креатиніну, при цьому біосенсор весь час між вимірюваннями залишався в робочому буферному розчині (рис. 10).

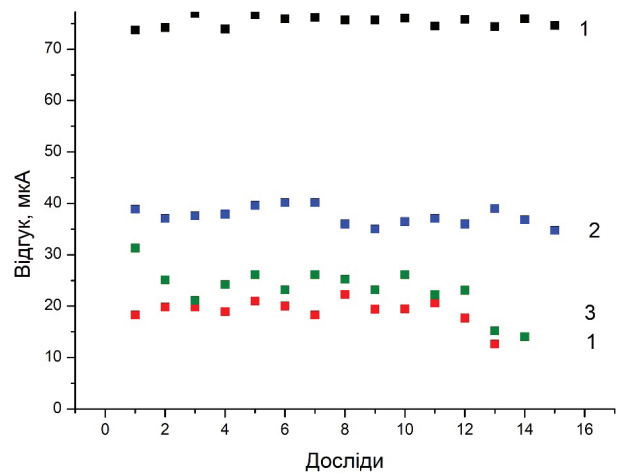


Рис. 10. Відтворюваність відгуків біосенсора на основі КД, іммобілізованої різними методами (1 – ковалентне зшивання в краплі ГА, 2 – захват в фотополімері PVA/SbQ методом 1, 3 – ковалентне зшивання в парах ГА, 4 – захват в фотополімері PVA/SbQ методом 2) на 5 мМ креатиніну. Вимірювання проводили в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,2 за кімнатної температури.

З рисунку видно, що всі отримані біосенсиори характеризувались високою відтворюваністю сигналів протягом робочого дня. Відносне стандартне відхилення відгуків не перевищувало 5%. Цей тест свідчить, що розроблений біосенсор можна використовувати для контролю концентрації креатиніну в діалізній рідині в процесі гемодіалізу, тому що одна процедура гемодіалізу зазвичай триває 3-4 години.

Щодо стабільності при зберіганні (рис. 11), то найкращі результати були отримані у випадку ковалентної іммобілізації в краплі ГА при зберіганні потенціометричного біосенсора на основі креатиніндеїмінази в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 за температури +4°C.

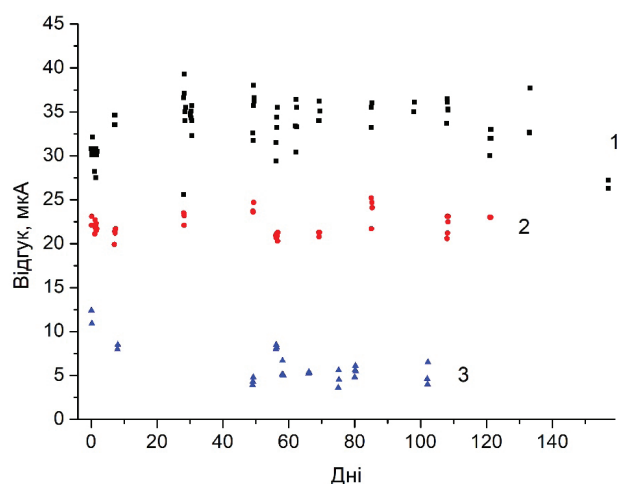


Рис. 11. Стабільність відгуків при зберіганні для біосенсора на основі КД, іммобілізованого різними методами (1 – ковалентне зшивання в краплі ГА, 2 – захват в фотополімері PVA/SbQ, 3 – ковалентне зшивання в парах ГА) на 5 мМ креатинін. Сенсори зберігали в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,2 за температури +4°C. Вимірювання проводили в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,2 за кімнатної температури.

Відгуки біосенсора залишались стабільними щонайменше протягом 150 днів. Збільшення ж величини відгуку в перший місяць на 15-20 % було викликане релаксацією ферменту в розчині після іммобілізації в біоселективній мембрані. Через 5 місяців зберігання спостерігалось падіння величини відгуку на 10-20 %. Для іммобілізації в фотополімері

PVA/SbQ спостерігалась стабільність відгуків на протязі 4 місяців, в той час як для іммобілізації в парах ГА величина відгуку сенсора впала на 50% за 100 днів зберігання.

Висновки

В роботі досліджено основні аналітичні характеристики потенціометричного біосенсора на основі креатиніндеїмінази при роботі з модельними зразками та проведено їхнє порівняння для різних методів іммобілізації фермента. Виявлено, що всі сенсори характеризуються подібним діапазоном роботи, часом відгуку та високою операційною стабільністю. В той же час чутливість біосенсора до креатиніну в розчині була в 2 рази вища для варіанту іммобілізації в краплі ГА. Стабільність при зберіганні була високою для всіх методів іммобілізації, за виключенням іммобілізації в парах ГА, коли величина відгуку сенсора впала на 50% за 100 днів зберігання. Залежності від умов проведення експериментів були типовими для ферментних біосенсорів та не залежали від методу іммобілізації фермента.

Таким чином, вибір методу іммобілізації креатиніндеїмінази залежить виключно від поставлених завдань та технологічності самої процедури іммобілізації для застосування її в подальшому для масового виробництва біосенсорів. Лінійний діапазон визначення креатиніну є цілком придатним для подальшої роботи з реальними зразками крові та діалізної рідини при розведенні їх в 10 разів.

Подяка

Роботу частково виконано за підтримки Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проектів НДР «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (проект № 2021.01/0010) та фонду Саймонс (США) (грант № 1290589).

Список використаної літератури

[1]. S. Dzyadevych, O. Soldatkin, V. Arkhypova, L. Shkotova, V. Pyeshkova, O. Saiapina, N. Jaffrezic-Renault, A. Soldatkin, A. Elskaya.

- Practical application of electrochemical enzyme biosensors // *Biopol. Cell*, 38(2), pp. 71-92 (2022).
- [2]. S. Narayanan, H. D. Appleton. Creatinine: A review // *Clin. Chem.* 26(8), pp. 1119-1126 (1980).
- [3]. V. M. Wong, S. J. Swartz, S. Devaraj, S. Poyyapakkam. Elevated serum creatinine: but is it renal failure // *Pediatrics*, 146(1), e20192828 (2020). <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2828>.
- [4]. N. Akter, A. Nessa, A. Sharmin, M. I. Dipa, S. Israt, S. Firoz, F. Yeasmin. Relationship of serum creatinine and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease // *Mymensingh Med. J.*, 29(4), pp. 779–783 (2020).
- [5]. R. Panimathi, E. Gurusamy, S. Mahalakshmi, K. Ramadevi, G. Kaarthikeyan, S. Anil. Impact of COVID-19 on renal function: a multivariate analysis of biochemical and immunological markers in patients // *Cureus*, 14(2), e22076 (2022). <https://doi.org/10.7759/cureus.22076>.
- [6]. B. R. Griffin, S. Faubel, C. L. Edelstein, Biomarkers of drug-induced kidney toxicity. *Ther. Drug Monit.*, 41(2), pp. 213–226 (2019). <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000589>.
- [7]. K. Doma, A. K. Ramachandran, D. Boullosa, J. Connor. The paradoxical effect of creatine monohydrate on muscle damage markers: a systematic review and metaanalysis // *Sports Med.*, 52(7), pp. 1623–1645 (2022). <https://doi.org/10.1007/s40279-022-01640-z>.
- [8]. B. Wax, C. M. Kerksick, A. R. Jagim, J. J. Mayo, B. C. Lyons, R. B. Kreider. Creatine for exercise and sports performance, with recovery considerations for healthy populations // *Nutrients*, 13(6), 1915 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13061915>.
- [9]. A. Zakalskiy, N. Stasyuk, M. Gonchar. Creatinine deiminase: characterization, using in enzymatic creatinine assay, and production of the enzyme // *Curr. Protein Pept. Sci.*, 20, pp. 465–470 (2019).
- [10]. I. Durán Merás, A. Espinosa-Mansilla, M. J. Rodríguez Gómes. Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection // *Anal. Biochem.*, 346(2), pp. 201-209 (2005).
- [11]. Y. Yokoyama, S. Tsuji, H. Sato. Simultaneous determination of creatinine, creatine, and UV-absorbing amino acids using dualmode gradient low-capacitycation-exchange chromatography // *J. Chromatogr. A.*, 1085(1), pp. 110-116 (2005).
- [12]. E. Pobozy, A. Radomska, R. Koncki, S. Głab. Determination of dialysate creatinine by micellar electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. B.*, 789, pp. 417-424 (2003).
- [13]. A. Zinellu, M. A. Caria, C. Tavera, S. Sotgia, R. Chessa, L. Deiana, C. Carru. Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector // *Anal. Biochem.*, 342(2), pp. 186-193 (2005).
- [14]. R. Huskova, P. Chrastina, T. Adam, P. Schneiderka. Determination of creatinine in urine by tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta*, 350(1-2), pp. 99-106 (2004).
- [15]. N. Ye. Stasyuk, G. Z. Gayda, A. E. Zakalskiy, L. R. Fayura, O. M. Zakalska, A. A. Sibirny, M. Nisnevitch, M. V. Gonchar. Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn (Hg) S nanoparticles, *Talanta*, 238(1) 122996 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996>.
- [16]. O. A. Zinchenko, S. V. Marchenko, T. A. Sergeyeva, A. L. Kukla, A. S. Pavlyuchenko, E. K. Krasnyuk, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya. Application of creatinine-sensitive biosensor for hemodialysis control // *Biosens. Bioelectron.*, 35, pp. 466-469 (2012).
- [17]. N. Stasyuk, A. Zakalskiy, W. Nogala, S. Gawinkowski, T. Ratajczyk, M. Bonarowska, O. Demkiv, O. Zakalska, M. Gonchar. A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-sensitive CoCu nanocomposite. *Sensors Actuators B*, 393, 134276 (2023).
- [18]. O. L. Kukla, A. S. Pavluchenko, S. V. Dzyadevych, V. M. Arkhypova, N. Jafrezic-Renault. Physical model of temporary current instability in ion-selective field-effect transistors with silicon oxide/nitride dielectric

layers // Sens. elektron. mikrosist. tehnol., 20(3), pp. 79-91 (2023).

[19]. K. Ichimura, S. Watanabe. Preparation and Characteristics of Photocrosslinkable Poly(vinyl Alcohol). Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, Vol. 20, 1419-1432 (1982)

[20]. E. M. Gottschalk, H. Hippe and F. Patzke. Creatinine deiminase (EC 3.5.4.2 1)

from bacterium BN 11: purification, properties and applicability in a serum/urine creatinine assay // Clinica Chimica Acta, 204, pp. 223-238 (1991).

[21]. W. Theodore, S. Esders, Shirley Y. Lynn. Purification and Properties of Creatinine Iminohydrolase from Flavobacterium filamentosum // Journal Biological Chemistry, 260(7), pp. 3915-3922 (1985).

Стаття надійшла до редакції 15.08.2024 р.

UDC 643.554, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312688>

COMPARISON OF CREATININE DEIMINASE IMMOBILIZATION METHODS FOR DESIGN OF POTENTIOMETRIC BIOSENSORS FOR CREATININE DETECTION

V. M. Arkhypova¹, I. S. Knyr^{1,2}, V. A. Bakhmat^{1,2}, Y. V. Karpenko¹, O. O. Soldatkin¹, S. V. Dzyadevych^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine
150 Zabolotnogo Str., Kyiv 03143, Ukraine, avalka@yahoo.com

²Taras Shevchenko National University of Kyiv
60 Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033, dzyad@yahoo.com

Summary

An important issue in the development of biosensors is the choice of the enzyme immobilization method and the reproducibility of the performance characteristics of biosensors after different series of immobilization of biological material. The paper presents a comparison of analytical characteristics of potentiometric biosensors based on creatinine deiminase for different enzyme immobilization methods.

Sensor chips with a differential pair of pH-sensitive field-effect transistors and the enzyme creatinine deiminase were used to create the biosensor. Immobilization was carried out by the method of covalent binding of enzyme molecules with glutaraldehyde and by entrapment of the enzyme in PVA/SbQ photopolymer.

It was found that all sensors are characterized by a similar operating range, response time and high operational stability. At the same time, the sensitivity of the biosensor to creatinine was 2 times higher for the variant of immobilization in a drop of glutaraldehyde. Storage stability was high for all immobilization methods, with the exception of immobilization in glutaraldehyde vapors, when the value of the sensor response dropped by 50% after 100 days of storage. The dependences on the experimental conditions were typical for enzyme biosensors and did not depend on the enzyme immobilization method. The linear range of creatinine determination is quite suitable for further work with real blood samples and dialysis fluid when diluted 10 times.

It has been established that the choice of the immobilization method of creatinine deiminase depends solely on the tasks and the manufacturability of the immobilization procedure itself for its subsequent use for the mass production of biosensors.

Keywords: Ion-selective field-effect transistor, biosensor, creatinine deiminase, creatinine analysis, immobilization

УДК 643.554, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312688>

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ

*В. М. Архипова¹, І. С. Кнур^{1,2}, В. А. Бахмат^{1,2}, Ю. В. Карпенко¹, О. О. Солдаткін¹,
С. В. Дзядевич^{1,2}*

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

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ, Україна, 01033, dzyad@yahoo.com

Реферат

Важливим питанням розробки біосенсорів є вибір методу іммобілізації фермента та відтворюваність робочих характеристик біосенсорів після різних серій іммобілізації біологічного матеріалу. В роботі представлено порівняння аналітичних характеристик потенціометричних біосенсорів на основі креатиніндеімінази для різних методів іммобілізації фермента.

Для створення біосенсора використовували сенсорні чипи з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів та фермент креатиніндеіміназа. Іммобілізацію проводили методом ковалентного зв'язування молекул фермента глутаровим альдегідом та за допомогою захвату фермента в фотополімер PVA/SbQ.

Виявлено, що всі сенсори характеризуються подібним діапазоном роботи, часом відгуку та високою операційною стабільністю. В той же час чутливість біосенсора до креатиніну була в 2 разів вища для варіанту іммобілізації в краплі глутарового альдегіду. Стабільність при зберіганні була високою для всіх методів іммобілізації, за виключенням іммобілізації в парах глутарового альдегіду, коли величина відгуку сенсора впала на 50% за 100 днів зберігання. Залежності від умов проведення експериментів були типовими для ферментних біосенсорів та не залежали від методу іммобілізації фермента. Лінійний діапазон визначення креатиніну є цілком придатним для подальшої роботи з реальними зразками крові та діалізної рідини при розведенні їх в 10 разів.

Встановлено, що вибір методу іммобілізації креатиніндеімінази залежить виключно від поставлених завдань та технологічності самої процедури іммобілізації для застосування її в подальшому для масового виробництва біосенсорів.

Ключові слова: іон-селективний польовий транзистор, біосенсор, креатиніндеіміназа, аналіз креатиніну, іммобілізація