

БІОСЕНСОРИ BIOSENSORS

УДК 547.495.2, 543.92, 543.066

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ УРЕАЗИ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ВМІСТУ СЕЧОВИНИ В РЕАЛЬНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

С. В. Марченко, О. П. Солдаткін

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Заболотного 150, тел/факс. 526 43 97, e-mail: svmarchenkosv@ukr.net

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ УРЕАЗИ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ВМІСТУ СЕЧОВИНИ В РЕАЛЬНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

С. В. Марченко, О. П. Солдаткін

Анотація. В роботі показано застосування високочутливого та селективного біосенсора на основі рН-чутливого польового транзистора та іммобілізованої рекомбінантної уреазі з модифікованим активним центром для визначення концентрацій сечовини. Оптимізовано основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора та визначено оптимальні умови проведення досліджень з реальними зразками. Проведено кількісне визначення вмісту сечовини в сироватці крові та діалізаті і проведено порівняльний аналіз даних біосенсорного визначення з контрольними загальноприйнятими методами (показано високу кореляцію).

Ключові слова: сечовина, біосенсор, рекомбінантна уреаза, рН-чутливий польовий транзистор, кров, діалізат

POTENTIOMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE RECOMBINANT UREASE FOR THE CONTROL OF THE UREA CONCENTRATION IN REAL BIOLOGICAL SAMPLES

S.V. Marchenko, O.P. Soldatkin

Abstract. An application of the highly sensitive and selective biosensor based on pH-sensitive field-effect transistor and immobilized recombinant urease with modified active site for urea analysis was shown in this work. The main analytical characteristics of the biosensor developed were determined; the conditions of urea measurement in real samples of blood were optimized. The quantitative determination of urea concentration in blood serum and dialysate was made and comparative analysis between the data of biosensor determination and control traditional methods was made too (the high correlation was shown).

Keywords: urea, biosensor, recombinant urease, pH-sensitive field-effect transistor, blood, dialysate

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ УРЕАЗЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВИНЫ В РЕАЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

С. В. Марченко, О. П. Солдаткин

Аннотация. В работе показано применение высокочувствительного и селективного биосенсора на основе рН-чувствительного полевого транзистора и иммобилизированной рекомбинантной уреазы с модифицированным активным центром для определения концентраций мочевины. Оптимизированы основные аналитические характеристики разработанного биосенсора, определены оптимальные условия для проведения исследований с реальными образцами. Было проведено количественное определение содержания мочевины в сыворотке крови и диализате и проведен сравнительный анализ данных биосенсорного определения с контрольными общепринятыми методами (показана высокая корреляция).

Ключевые слова: мочевина, биосенсор, рекомбинантная уреазы, рН-чувствительный полевой транзистор, кровь, диализат

Вступ

Сечовина – головний і кінцевий продукт обміну білків, синтез якої відбувається в печінці з діоксиду вуглецю та амонію в результаті дезамінування амінокислот. З печінки сечовина потрапляє в кров, а далі в нирки, де і відбувається її фільтрація та виведення з сечею. Зниження вмісту сечовини в плазмі крові спостерігається рідко і є характерним для пацієнтів з тяжким захворюванням печінки чи недостатнім вживанням білку. Дуже високий рівень сечовини в сироватці крові пов'язаний з тяжкою нирковою дисфункцією і називається синдромом уремії. В такому випадку необхідно проводити гемодіаліз чи трансплантацію нирки. Здебільшого надають перевагу першому варіанту.

Фізіологічний рівень сечовини знаходиться в межах 2,5–7,5 мМ [1] залежно від харчування. Значне підвищення концентрації сечовини спостерігається під час хронічної та гострої форм ниркової недостатності (50–70 мМ та 120–150 мМ, відповідно). Такий патологічний рівень сечовини можна знизити до 10 мМ за рахунок гемодіалізу чи перитоніального діалізу. Рівень сечовини у діалізаті може варіювати від 3 до 16 мМ [2].

Для встановлення ранньої стадії ниркової недостатності необхідно визначати кліренс сечовини. Кліренсом називається співвідно-

шення між загальною кількістю речовини, яка виводиться із сечею за добу і концентрацією речовини у крові. Нормальний кліренс сечовини становить 64–99 мл/хв і залежить від віку та статі. Таким чином, для діагностування різних порушень у хворих необхідно виконувати складні та багатократні аналізи на сечовину [3].

Для моніторингу рівня сечовини існує три групи методів. До методів першої групи умовно можна віднести хімічні методи з колориметричною детекцією. До колориметричних реагентів відносяться діацетилмонооксим, фталальдегід, нафтилетилендіамін, хромотропова кислота [4]. Одним із найбільш популярних реактивів в сучасній клінічній діагностиці сечовини являється діацетилмонооксим [5]. Але основний недолік цього методу – світлочутливість комплексу і швидке зниження його забарвлення, що частково компенсується введенням в реакцію стабілізатора тіосемикарбазиду. Іншим недоліком методу являється токсичність реактивів для проведення даної реакції.

Другу групу представляють ферментативні методи. Всі сучасні ферментативні методи визначення сечовини ґрунтуються на використанні ферменту уреазы. Метод складається з двох етапів. На першому при гідролізі сечовини утворюється іон амонію, концентрацію якого (другий етап) визначають з використанням по-

слідовних ферментативних реакцій, потенціометричних методів чи технології «сухої хімії».

Найбільш популярний ферментативний метод визначення сечовини в сироватці крові чи сечі ґрунтується на використанні уреазы для розщеплення сечовини, та глутаматдегідрогенази в якості індикаторного ферменту, для визначення амонію. Реакція проходить за участю кофермента НАДН₂, кетоглутарату та АТФ з утворенням глутамінової кислоти і АДФ. Ця реакція спряжена з окисленням НАДН₂ до НАД, що супроводжується зміною оптичної щільності розчину, яку в даному випадку контролюють при довжині хвилі 340 нм [6].

Слід зауважити, що вище наведені методи складні у використанні в зв'язку з цілим комплексом реакцій, на яких ґрунтується аналіз, потребують попередньої пробопідготовки, необхідний контроль температури, рН і непридатні для on-line вимірювань.

До третьої умовної групи методів контролю рівня сечовини відносять біосенсиори. На сьогоднішній день створено цілу низку уреазних біосенсорів, де в якості чутливого елемента виступає фермент уреазы: амперометричних [7], потенціометричних [8], кондуктометричних [9] та оптичних [10]. Але, не зважаючи на значний розвиток біосенсорів для моніторингу сечовини, дуже рідко підкреслюють недоліки пов'язані з їх практичним застосуванням. Головним недоліком таких біосенсорів є вузький лінійний діапазон визначення, тому перед вимірюванням необхідно в значній мірі розводити біозразки, що призводить до зниження точності аналізу. Одним із підходів для вирішення даної проблеми є використання рекомбінантного ферменту уреазы з модифікованим активним центром [11]. Рекомбінантна уреазы з *E. coli* має заміну в активному центрі: гістидин 219 замінено на інший амінокислотний залишок, за рахунок чого змінюється спорідненість до субстрату. В результаті *K_m* рекомбінантного ферменту зростає до 200 мМ, порівняно з уреазою з традиційного джерела виділення (боби сої) виробництва фірми «Флюка», *K_m* якої становить 3–8 мМ [12, 13].

Таким чином, метою даного дослідження є застосування біосенсора на основі рН-чутливого польового транзистора та іммобілі-

зованої рекомбінантної уреазы для контролю рівня сечовини в процесі гемодіалізу та для кількісного моніторингу в сироватці крові хворих на ниркову недостатність.

Матеріали і методи

Матеріали

В роботі використовували фермент уреазы з *E. coli* (КФ 3.5.1.5) з активністю 150 од.акт./мг виробництва фірми «Usbiological» (США), сироватковий альбумін бика фракція V виробництва фірми «Sigma» (Німеччина), 25 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми «Sigma-Aldrich Chimie», сечовина фірми «Sigma» (США). Робочим буферним розчином був фосфатний буфер (КН₂РО₄-NaOH), рН 7,4 фірми «Helicon» (Москва, Росія). Інші, використані в роботі реактиви, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.»

Діалізат та сироватка крові для досліджень на вміст сечовини були люб'язно надані Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу.

Сенсорні елементи на основі рН-чутливих польових транзисторів

Для створення сенсорних елементів була використана *p*-канальна МОН-технологія на кремнієвих підкладках КЕФ-4,5 <100> з формуванням підзатворного діелектричного шару на основі плівки SiO₂ завтовшки 50 нм, отриманої термічним окисленням, та плівки Si₃N₄ завтовшки 50-70 нм, осадженої в реакторі зниженого тиску. Затвор виконано зигзагоподібним з відношенням його довжини до ширини, рівним 100, що забезпечує достатньо високий коефіцієнт підсилення *p*-канальних транзисторів. Контакти до стоку та витоку транзисторів сформовані за допомогою протяжних дифузійних шин, вкритих шаром діелектрика, що виведені на край кристалу, де проводиться їх розварювання та герметизація.

Кожен сенсорний чип містив два польових транзистори, що дозволяє проводити вимірювання в диференційному режимі, коли один з

транзисторів використовується як референтний, а на затвор іншого наносять чутливу біоселективну мембрану. Це дозволяє значно послабити вплив таких факторів, як коливання температури, рН та іонної сили розчину, світла і електромагнітних ефектів на результати вимірювань.

Вимірювання відгуку рН-ПТ відбувалося за допомогою схеми підтримання постійної величини струму в каналі транзистора, при цьому вихідний сигнал автоматично відслідковував зміну потенціалу поблизу затвора транзистора. Порогова напруга для всіх рН-ПТ була близько - 2,5 В. Вимірювання проводились за таких умов: струм каналу близько 20 мкА, напруга стік-витік близько 1 В, підкладка під нульовим потенціалом.

Детальний опис топології, дизайну та сенсорної електроніки використаних рН-ПТ елементів наведено в роботі [14].

Процедура виготовлення біоселективних мембран

Для виготовлення робочої мембрани на основі рекомбінантної уреазы готували розчин з вмістом: 10% рекомбінантна уреазы + 10 % БСА. Наважки ферменту та БСА розчиняли у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 з 10% гліцерином, який використовувався для стабілізації ферменту при іммобілізації та для запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали БСА, кінцева концентрація якого становила 20 %. Перед нанесенням робочі поверхні перетворювачів знежирювали етанолом та промивали дистильованою водою. Отримані розчини за допомогою мікропіпетки «Eppendorf» 0,1-2,5 мкл наносили на робочі поверхні рН-ПТ до повного їх покриття. Всі мембрани були з однаковим кінцевим вмістом білку. Для полімеризації мембран датчики поміщали в атмосферу насичених парів ГА на 20 – 30 хв за кімнатної температури. Потім мембрани висушували протягом 15–20 хв на повітрі.

Формування додаткових мембран

Для формування додаткових мембран використовували негативно заряджений полімер Nafion [15], який виконує роль іоноселективної мембрани та обмежує дифузію аніонів. Готували 1 % розчин полімеру в 10 мМ фосфатному буфері рН 7,4.

Далі 0,1 мкл розчину Nafion наносили поверх ензиматичної та референтної мембран та витримували на повітрі 15 хв. Перед початком роботи мембрани відмивали робочим буферним розчином від надлишку нез'язаного ГА до стабілізації базового сигналу.

Визначення вмісту сечовини у модельних розчинах

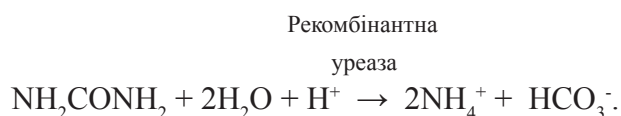
Визначення концентрацій сечовини в модельних розчинах проводили в 5 мМ калій-фосфатному буферному розчині, рН 7,4, за кімнатної температури. Використовували робочу комірку відкритого типу об'ємом 1,5 мл з інтенсивним перемішуванням. Концентрацію субстрату змінювали, додаючи певні аліквоти вихідного концентрованого розчину. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали від продукту, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази кожні 2 хв.

Визначення вмісту сечовини в сироватці крові та діалізаті

Аналіз сечовини проводили в 10 пробах сироватки крові хворих на ниркову недостатність та 10 пробах діалізату. Вимірювання за допомогою потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої рекомбінантної уреазы проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури. Визначення концентрації сечовини в аналізованих зразках здійснювали за калібрувальною кривою. Кінцеве розведення сироватки крові та діалізату у вимірювальній комірці становило 10 разів.

Результати та обговорення

Біосенсор було розроблено на основі рН-чутливих польових транзисторів та ферменту рекомбінантна уреаза. При аналізі сечовини біосенсорним методом сечовина потрапляє в біоселективну мембрану біосенсора та в результаті ферментативного гідролізу розщеплюється до двох іонів амонію та іону бікарбонату [1–2, 16]:



В ході ферментативної реакції відбувається поглинання протонів з розчину, що призводить до збільшення рН робочого буферного розчину в біоселективній мембрані над робочим рН-ПТ, що, власне, і є причиною виникнення сигналу потенціометричного біосенсора.

При біосенсорному визначенні концентрації сечовини в модельному розчині отримана калібрувальна крива, яка була лінійною в діапазоні концентрацій 0,5–15 мМ (Рис.1). Мало місце розширення лінійності порівняно з аналогічною калібрувальною кривою (діапазон лінійності – 0,02–0,16 мМ), отриманою для біосенсора на основі уреази із бобів сої [17].

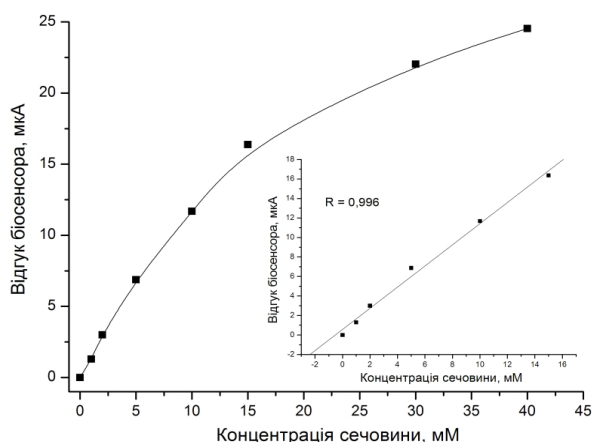


Рис. 1. Калібрувальна крива визначення концентрації сечовини в модельному розчині. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури.

Таке розширення лінійного діапазону пов'язане з використанням в роботі ферменту рекомбінантна уреаза із *E. coli*, яка має підвищену $K_m = 200$ мМ. Як відомо, біосенсор на основі уреази з класичного джерела походження [17] має вузький лінійний діапазон і відповідно K_m 3–8 мМ [12, 18]. Відомо, що K_m — константа Міхаеліса-Ментен — це та концентрація субстрату, за якої швидкість реакції складає половину максимальної та є показником насичення фермента субстратом. Тобто чим більша буде величина K_m , тим за вищої концентрації субстрату буде досягатись насичення ферменту субстратом, а, відповідно, біосенсор буде характеризуватись ширшим діапазоном концентрацій визначення субстрату [19].

Було досліджено аналітичні характеристики біосенсора при роботі з модельними зразками, виявлено, що сенсор характеризувався високою операційною стабільністю, достатньою стабільністю при зберіганні та мав лінійний діапазон визначення придатний для роботи з реальними зразками при розведенні в 10 разів.

Як відомо з літературних даних, сироватка крові, а також діалізат, який за складом дуже схожий до першої являються складними об'єктами для аналізу. Кров — багаторівнева буферна система, рН якої становить 7,37–7,44 із середньою величиною 7,4. До складу крові входять органічні та небілкові азотисті компоненти, амінокислоти, електроліти, клітини, ферменти, ліпопротеїди, білки та ін. [20]. Враховуючи вищенаведене, було доцільним дослідити вплив реальних зразків, які містили та не містили сечовину, на відгук біосенсора. Для отримання проб сироватки крові та діалізату, що не містили сечовину, додавали певну кількість ферменту уреаза та інкубували близько години, обережно перемішуючи час від часу, щоб видалити ендогенну сечовину. Далі таку пробу, в якій вже не було сечовини, вносили у вимірювальну комірку та отримували відгуки.

Як можна бачити з Рис. 2 додавання аліквот сироватки крові чи діалізату спричиняло виникнення відгуку біосенсора, аналогічного за формою до відгуку на чисту сечовину. Тоді ж як додавання сироватки крові (діалізату), попередньо інкубованої з ферментом, призводило

до незначного стрибка сигналу, який повертався на базову лінію за рахунок відсутності сечовини в зразку. Наведені результати свідчать про те, що сироватка/діалізат крові хворих на ниркову недостатність при розведенні в 10 разів фактично не викликає неспецифічного відгуку, а розроблений біосенсор на основі рекомбінантної уреазы є високоселективним до сечовини.

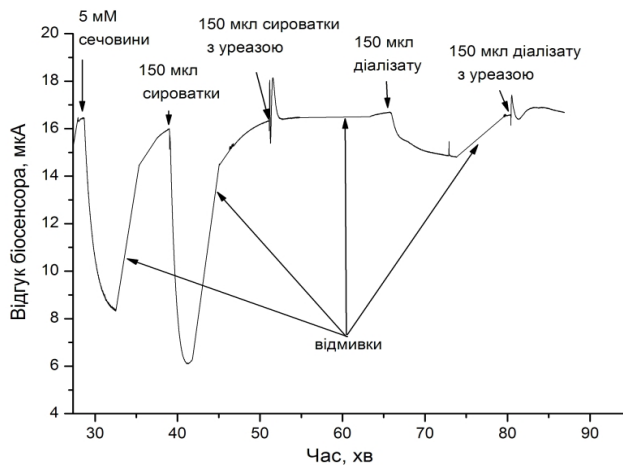


Рис. 2. Типові відгуки біосенсора на внесення у вимірювальну комірку субстрату та аліквот сироватки і діалізату крові без та з уреазою. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури.

Наступним етапом дослідження було визначення вмісту сечовини в зразках сироватки та діалізату крові хворих на ниркову недостатність. Для визначення концентрації сечовини в пробах було застосовано класичний біосенсорний метод за калібрувальною кривою.

Процедура визначення невідомої концентрації сечовини в реальних зразках полягала в наступному. До електрохімічної комірки об'ємом 1,5 мл додавали відому концентрацію сечовини, а потім, після відмивки, - 150 мкл проби (сироватка крові чи діалізат), з врахуванням загального об'єму комірки, що призводило до кінцевого розведення зразку в 10 разів. Відгук на відому концентрацію сечовини використовували для оцінки стабільності біосенсора. За величиною відгуку отриманого на пробу реального зразку та калібрувальною кривою оцінювали вміст сечовини.

Таким чином було визначено невідому концентрацію сечовини в 10 пробах сироватки крові хворих на ниркову недостатність. На Рис. 3 представлено результати аналізу, отримані за допомогою розробленого біосенсора та двох контрольних методів. З рисунку та розрахованого коефіцієнту кореляції видно, що краще корелюють дані, отримані за допомогою біосенсора та ферментної системи Уреаза/Пероксидаза, $R=0,97$, що може бути пов'язаним із використанням в обох випадках ферментативних реакцій в основі методів. У випадку ж хімічного аналізу на основі діацетилмонооксимної реакції основним недоліком є світлочутливість комплексу, який утворюється, і впливає на результати аналізу, про що і може свідчити коефіцієнт кореляції $R=0,73$.

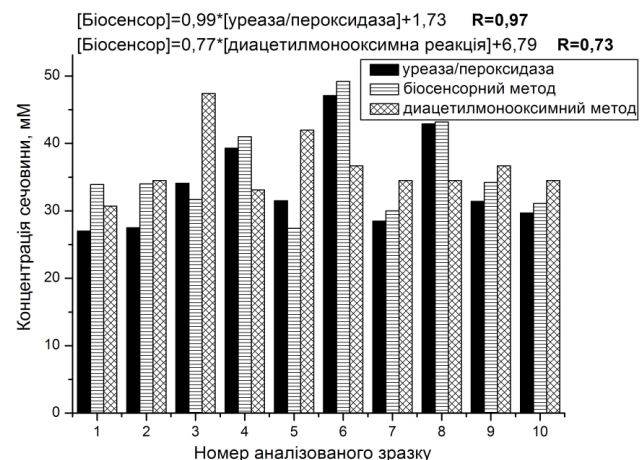


Рис. 3. Порівняння даних визначення сечовини в зразках сироватки крові, отриманих за допомогою біосенсорного методу на основі рекомбінантної уреазы та двох контрольних методів.

Розроблений біосенсор на основі рекомбінантної уреазы було також апробовано для аналізу зразків діалізату хворого на ниркову недостатність. Концентрацію сечовини визначали класичним біосенсорним методом за калібрувальною кривою, як і у випадку сироватки крові. Для проведення аналізу зразки діалізату хворого відбирали з апарату штучна нирка через певні проміжки часу та визначали рівень сечовини. На Рис. 4 представлено динаміку зміни сечовини в діалізаті.

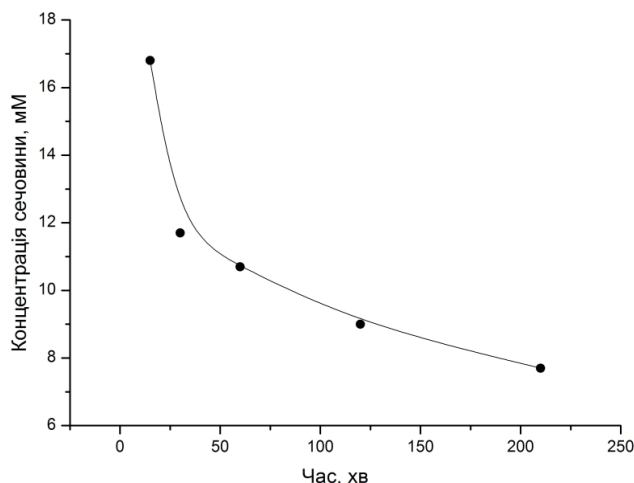


Рис. 4. Динаміка зміни концентрації сечовини в діалізаті хворого протягом процедури гемодіалізу. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури.

Перше визначення було проведено після 15 хв від початку процедури гемодіалізу. Концентрація сечовини в цій пробі була значною і перевищувала норму (норма 2,5 – 7,5 мМ). Протягом 3,5 годин процедури діалізу рівень сечовини в діалізаті хворого знизився на 70% порівняно з концентрацією в першій пробі і становив 7,7 мМ, що можна вважати верхньою границею норми для хворого на ниркову недостатність.

Для оцінки розробленої біоаналітичної системи отримані результати були порівняні з контрольним методом. Як контрольний метод для визначення концентрацій сечовини у діалізаті хворого було використано традиційний для клінічної практики метод колориметричного ферментативного визначення. Як відомо, сечовина гідролізується уреазою до амонію та диоксиду вуглецю. В присутності гіпохлориту та саліцилату амоній дає зелене забарвлення (модифікована реакція Бертло) [6]. Поглинання при 578 нм пропорційне концентрації сечовини у зразку.

На Рис. 5 представлено порівняльні результати аналізу, отримані за допомогою біосенсорного методу на основі рекомбінантної уреазы та колориметричного ферментативного визначення сечовини. Слід відзначити високу кореляцію даних між біосенсорним та контр-

ольним методом, про що свідчить коефіцієнт кореляції $R=0,98$.

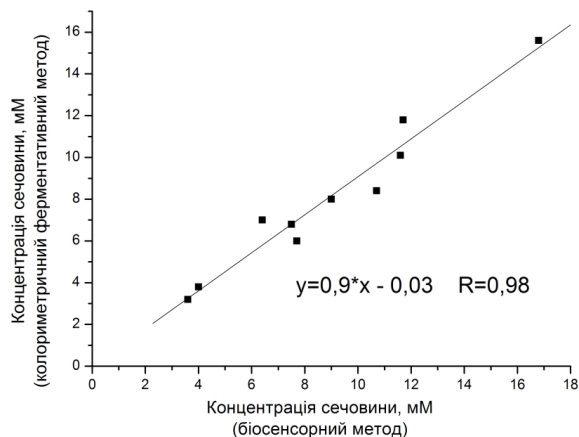


Рис. 5. Кореляція даних, отриманих за допомогою біосенсорного методу та колориметричного ферментативного визначення сечовини в зразках діалізату хворого на ниркову недостатність.

Врешті-решт, було досліджено одну з найважливіших аналітичних характеристик роботи біосенсора – відтворюваність відгуків, а, відповідно, точність аналізу. Вимірювання проводили як за умов визначення сечовини в модельних розчинах, так і в реальних зразках (сироватка крові, діалізат). Для дослідження цього робочого параметру, впродовж одного робочого дня з інтервалом 30 хв вимірювали відгук на одну і ту ж концентрацію субстрату 5 мМ сечовина у випадку модельних розчинів, і 150 мкл зразку (сироватка крові, діалізат) у випадку реальних проб. Як можна бачити з Рис. 6, біосенсор в обох варіантах демонстрував високий рівень відтворюваності сигналів. Стандартне відхилення у всіх випадках не перевищувало 5%.

Таким чином, за допомогою розробленого біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та рекомбінантної уреазы проведено кількісний аналіз концентрацій сечовини в реальних зразках (сироватка крові, діалізат). Дані біосенсорного вимірювання порівнювали з контрольними методами. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора та контрольних методів. У випадку сироватки крові коефіцієнт кореляції склав $R=0,97$ для біосенсорного методу та аналізу

з використанням ферментної системи Уреаза/Пероксидаза. Результати біосенсорного визначення в діалізаті хворих на ниркову недостатність порівнювали з колориметричним ферментативним методом визначення сечовини, де також відмічено високу кореляцію отриманих результатів, коефіцієнт кореляції $R=0,98$.

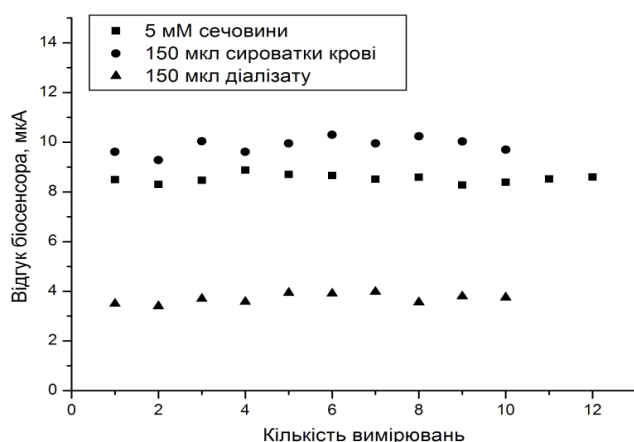


Рис. 6. Результати дослідження відтворюваності сигналів біосенсора при визначенні сечовини в модельних розчинах та реальних зразках. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури.

Також слід відмітити, що розробка потенціометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы з розширеним лінійним діапазоном визначення сечовини дозволяє значно зменшити розведення біологічних зразків, що у свою чергу, мінімізує похибку вимірювань. Крім того, планується розробка біосенсорної системи для одночасного визначення сечовини та креатиніну, не менш важливого маркера ниркової недостатності, тому розведення в 10 разів, яке було обрано при роботі з реальними зразками дозволить одночасно визначати вказані вище метаболіти.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».

Список використаної літератури

1. Dhawan G., Sumana G., Malhotra B. D., Recent development in urea biosensors // *Biochemical Engineering Journal.* – 2009.- Vol. 44. – P. 42 – 52.
2. Koncki R., Recent development in potentiometric biosensors for biomedical analysis // *Analytica Chimica Acta.* – 2007. – Vol. 599. – P. 7 – 15.
3. Gutiérrez M., Alegret S., del Valle M., Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples // *Biosensor and Bioelectronics.* – 2008. – Vol. 23. – P. 795 – 802.
4. Jurkiewicz M., Alegret S., Almirall J., García M., Fàbregas E., Development of a biparametric bioanalyser for creatinine and urea. Validation of the determination of biochemical parameters associated with hemodialysis // *Analyst.* – 1998. – Vol. 123. – P. 1321 – 1327.
5. Fearon W. R., The carbamide diacetyl reaction: a test for citrulline // *Biochem. J.* – 1939. – Vol. 33. – P. 902 – 907.
6. http://www.terramedica.spb.ru/1d4_2007/slepushiva.htm
7. Stred'ansky M., Pizzariello A., Stred'anska S., Miertus S., Amperometric pH-sensing biosensor for urea, penicillin, and oxalacetate // *Analytica Chimica Acta.* – 2000. – Vol. 415. – P. 151 – 157.
8. Rajesh V. Bisht, Takashima W., Kaneto K., Development of a potentiometric urea biosensor based on copolymer poly(*N*-3-aminopropyl pyrrole-co- pyrrole) film // *React. Funct. Polym.* – 2005. – Vol. 62. – P. 51 – 59.
9. Castillo-Ortega M. M., Rodriguez D. E., Encinas J. C., Plasctncia M., Mendez-Velarde F. A., Olayo R., Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(*n*-butyl methacrylate) composites // *Sens. Actuators B.* – 2005. – Vol. 85. – P. 19 – 25.
10. Koncki R., Lenarczuk T., Radomska A., Glab S., Optical biosensor based on Prus-

- sian Blue films // *Analyst*. – 2001. – Vol. 126. – P. 1080 – 1085.
11. *Steyert S. R., Rasko D. A., Kaper J. B.*, Functional and Phylogenetic Analysis of *ureD* in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – Vol. 193. – № 4. – P. 875 – 886.
 12. *Krajewska B.*, *Urease I*. Functional, catalytic and kinetic properties: A review // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2009. – Vol. 59. – P. 9 – 21.
 13. *Mangaldas K. S., Rajput Y. S., Sharma R.*, Urease immobilization on arylamine glass beads and its characterization // *J. Plant Biochemistry and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 19. – № 1. – P. 73 – 77.
 14. *Кукла А. Л., Павлюченко А. С., Голтвянский Ю. В., Ширшов Ю. М.*, Многоэлементные сенсорные массивы на основе интегральных кремниевых ионоселективных полевых транзисторов для систем химического мониторинга // *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. – 2007. – Вып. 42. – С. 72-79.
 15. *Gorchkov D. V., Soldatkin A. P., Poyard S., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.*, Application of charged polymeric materials as additional permselective membranes for improvement of the performance characteristics of urea-sensitive enzymatic field effect transistors. 1. Determination of urea in model solutions // *Materials Science and Engineering C*. – 1997. – № 5. – P. 23 – 28.
 16. *Melo de J. V., Soldatkin A. P., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S.*, Use of competitive inhibition for driving sensitivity and dynamic range of urea ENFETs // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2003. – № 18. – P. 345 – 351.
 17. *Марченко С. В., Зінченко О. А., Кукла О. Л., Павлюченко О. С., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П.*, Оптимізація біосенсорного визначення концентрації сечовини в сироватці крові людини // *Сенсорна електроніка і мікросистемні технології*. – 2012. – Т. 3(9). – № 1. – С. 53 – 61.
 18. *Godjevargova T., Gabrovska K.*, Kinetic parameters of urease immobilized on modified acrylonitrile copolymer membranes in the presence and absence of Cu(II) ions // *Macromolecular Bioscience*. – 2005. – № 5. – P. 459 – 466.
 19. *Ленинджер А.*, Основы биохимии. – М: Мир, 1985. – Т. 1. – С. 231 – 238.
 20. *Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.*, Биологическая химия. – М: Медицина, 1998. – С. 567 – 591.