

Протеолитический биосенсор на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. 1. Изучение сравнительных характеристик нативного и иммобилизованного трипсина для создания энзимобиосенсора

О. А. Белоиван*, А. П. Солдаткин, Н. Ф. Стародуб¹, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143 Киев, Заболотного 150

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
252030 Киев, Леонтовича, 9

Проанализированы методы иммобилизации трипсина с точки зрения сенсорной технологии. Проведена иммобилизация трипсина на полупроводниковую поверхность путем поперечной сшивки в белковой мембране в парах глутарового альдегида (ГА). Подобраны оптимальные условия этого процесса: отношение трипсин : БСА — 1:4, время инкубации в парах ГА — 2 ч при комнатной температуре. Изучено влияние стабилизирующих добавок глицерина и сахарозы на характеристики мембраны. Добавление 2,0–2,5% глицерина повышает активность мембран и уровень адгезии к поверхности. Проведено сравнительное исследование каталитических характеристик свободного и иммобилизованного трипсина, таких как K_m , зависимость активности фермента от рН, буферной емкости и ионной силы анализируемого раствора. Результаты обсуждены с позиции возможности использования полученных мембран в качестве чувствительного элемента протеолитического биосенсора.

Введение. Решение проблемы интеграции трипсина с полупроводниковой поверхностью является составной частью процесса разработки биосенсора для определения общего белка в биологических жидкостях. Создание такого устройства возможно на основе рН-чувствительных полевых транзисторов (рН-ПТ) и ферментов протеаз, в частности, трипсина, обладающего высокой стабильностью, относительно низкой избирательностью к расщепляемому белку и рН-оптимумом в области, близкой к нейтральной [1, 2].

К энзимоматрицам для биосенсоров на основе рН-ПТ предъявляют ряд требований по технологичности их изготовления, адгезии к поверхности преобразователя, диффузной проницаемости для молекул субстратов и продуктов, уровня включения ферментов, сохранения их активности при иммобилизации [3]. Способ изготовления матриц должен быть также, по возможности, простым, в достаточной степени малочувствительным к случайным отклонениям условий от идеальных и относительно дешевым. С этой точки зрения нами проанализированы существующие методы иммобилизации трипсина [4]. Некоторые из этих методов представлены в табл. 1. Как правило, большинство из них представляет собой многостадийный процесс, требующий использования дорогих и дефицитных реактивов, применения специальных устройств для активации и поддержания условий

*Correspondence address.

Таблица 1
Методы иммобилизации трипсина и их особенности

Носитель	Тип связи с носителем	Основные характеристики биомембран	Технологические особенности иммобилизации
Полиакриламид, обработанный ГА, в форме капли	Ковалентное связывание	Механически прочная мембрана, не подвергается микробным воздействиям, химически стабильна. Сохраняется 14—69 % активности свободного фермента	Специальное устройство для активации (14 ч при 37 °С). Отмывка 24 ч. Иммобилизация 12 ч при 4 °С
Активированные CNBr сополимеры акриламид-2-гидроксиметакрилата в форме капли	То же	То же	Активация при 4 °С, pH 10,8. Иммобилизация 2 ч при 4 °С
Сополимеры акриламида и акриловой кислоты в форме капли	То же	То же	Одновременная активация со связыванием фермента в течение 2—4 ч при 4 °С
Гидразидные производные гидроксиметакрилатного геля	То же	Очень низкая протеолитическая активность	Активация при 0 °С. Удельное связывание 4 мкМ трипсина на 1 г сухого вещества геля
Имидоэфирсодержащий полиакрилонитрил	То же	Активность трипсина полностью сохраняется в течение года. Повышается его термостабильность	Спецоборудование, необходимость контроля pH. Процесс несовместим с сенсорной технологией
Полиакриламидный гель	Механическое включение с частичным ковалентным связыванием	Активность фермента падает в 2,5—8,0 раз, повышается термостабильность, кинетические характеристики фермента практически не меняются	Многостадийный процесс с перемешиванием и охлаждением, требует дефицитных реактивов. Используется для колонок
2-Гидроксиэтилметакрилат, поперечно сшитый этиленгликольметакрилатом	То же	Гель мелкопористый, содержит 40 % воды, активность варьирует в пределах 5—89 %	Сложная технология приготовления геля, необходимость в вакууме, спецоборудовании
Пористое стекло	Ионное взаимодействие, водородные связи, ковалентное связывание	Возможность получения мембран с заданными размерами пор. Фермент прочно связан с носителем	Процесс зависит от pH, температуры, ионной силы. Проблема совмещения мембраны с датчиком

реакции в течение длительного времени. Кроме того, эти методы иммобилизации трипсина не учитывают требования к адгезии матрицы к поверхности (в частности, к полупроводниковым поверхностям) и к механической прочности получаемых мембран, что необходимо для их многократного использования. Существующие разработки энзимосенсоров на основе pH-ПТ и фермента трипсина включают использование метода пришивки глутаровым альдегидом из раствора [5]. Последний широко применяется для иммобилизации различных ферментов на поверхность электродов [6] и транзисторов [7, 8] в силу своей простоты и прочности получаемых мембран. В 1988 г. Кимура с соавт. предложили метод иммобилизации в парах глутарового альдегида (ГА) для уреазы и глюкозооксидазы на поверхность pH-ПТ. Такой способ позволяет сохранить форму нанесенной капли и более технологичен [9]. Этот метод был модифицирован и применен позже нашими сотрудниками для включения уреазы и глюкозо-

оксидазы в состав биосенсоров [10]. Показаны его преимущества, учитывая, прежде всего, адгезию матриц к поверхности преобразователя, удельную степень нагрузки ее биологическим материалом, сохранение активности последнего. Все вышеизложенное позволило нам сделать вывод о возможности опробования данного метода при иммобилизации трипсина на поверхность pH-ПТ для создания энзимосенсора. В настоящей работе представлены экспериментальные данные по выбору оптимальных условий иммобилизации трипсина, стабилизации и хранения полученных мембран, а также сравнительное исследование кинетических характеристик и свойств иммобилизованного и свободного трипсина.

Материалы и методы. В работе использовали препарат трипсина (ЕС 3.4.21.4) из поджелудочной железы быка с активностью 500 ед. ВАЕЕ/мг производства «Srofa» (Чехия); субстрат бензоил-аргинин-*p*-нитроанилин (БАПНА), синтезированный в лаборатории биосинтеза биологически активных веществ ИМБиГ НАН Украины, бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Seriva», 25 %-й раствор глутарового альдегида фирмы «Fluka»; другие реактивы отечественного производства с квалификацией «осч» и «хч».

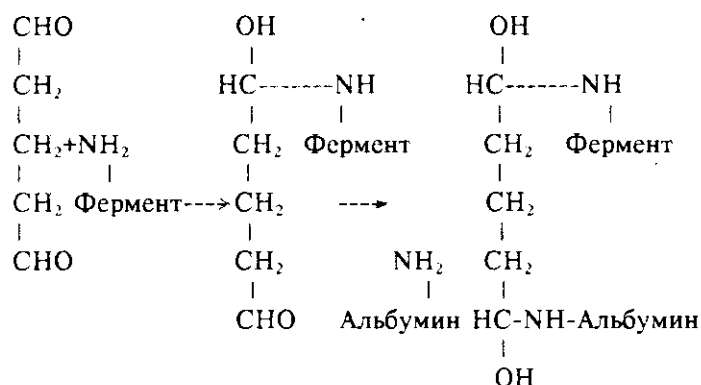
Для проведения измерений готовили следующие буферные растворы: 2,0—200,0 мМ фосфатный ($K_2HPO_4-NaH_2PO_4$), pH 7,5; 20,0 мМ фосфатный ($K_2HPO_4-NaH_2PO_4$), pH 6,0—8,0, ацетатный ($CH_3COONa-CH_3COOH$), pH 4,0—5,0 и боратный (H_3BO_3-NaOH), pH 9,0, согласно существующим методикам [11, 12]. В качестве полупроводниковых структур использовали кремниевые пластины площадью 0,25 см, покрытые SiO_2 и Si_3N_4 толщиной 0,8—1,0 мкм. Структуры обезжиривали насыщенным раствором бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) в концентрированной серной кислоте и промывали тщательно бидистиллированной водой.

Для формирования биоматрицы 5 мкл исходной смеси (состав приведен в разделе «Результаты и обсуждение») наносили на кремниевые пластины и помещали в атмосферу насыщенных паров ГА. После инкубации мембраны высушивали на воздухе и промывали буфером. Адгезию матриц к поверхности преобразователя оценивали по наличию их на кремниевых пластинах после встряхивания пластин с мембранами в буфере в течение 24 ч. Относительная единица адгезии соответствует 100 %-му сохранению мембран на кремниевых пластинах.

Активность фермента определяли фотометрически. Для этого готовили 55 мМ исходный раствор субстрата БАПНА в диметилформамиде (ДМФА) на водяной бане (50 °С) при постоянном перемешивании и затем охлаждали до комнатной температуры. Инкубационная смесь содержала 960 мкл 20 мМ фосфатного буфера (pH 7,8) и 60 мкл раствора субстрата БАПНА, 100 мкл 5 %-го раствора трипсина (в случае свободного фермента) или пластину с нанесенной мембраной и дополнительные 100 мкл буфера для сохранения общего объема (в случае иммобилизованного трипсина). Реакцию осуществляли при температуре 30 °С и останавливали через 30 мин добавлением 20 мкл 30 %-го раствора уксусной кислоты. Светопоглощение раствора измеряли при 405 нм на спектрофотометре MR-700. Концентрацию продукта реакции *p*-нитроанилина определяли по калибровочной кривой. Единица активности фермента соответствует образованию 1 мкмоль *p*-нитроанилина на 1 мкг трипсина за 1 мин в условиях проведения реакции. Значения K_m рассчитывали по методу Лайнуивера — Бэрка.

Результаты и обсуждение. Сшивка ферментов ГА представляет собой реакцию между этим бифункциональным агентом и свободными аминогруппами фермента. Реакция образования связи между аминогруппами и ГА практически необратима, она устойчива при экстремальных значениях pH и температуры [6]. Добавление в мембрану БСА, как правило, повышает

активность иммобилизованного фермента. Реакции, протекающие в этом случае, могут быть представлены следующей схемой:



Для выбора оптимальных условий иммобилизации трипсина на полупроводниковую поверхность были опробованы различные соотношения концентраций трипсин:БСА в мембране, а также различное время обработки в парах ГА. Основными критериями оценки являлись активность иммобилизованного фермента и адгезия мембран к поверхности кремниевых пластин. Полученные данные представлены в табл. 2 и на рис. 1 соответственно. Как видно из представленных результатов, максимальная активность фермента (28 %) сохранялась при соотношении концентраций трипсин:БСА в мембране 1:4 и времени обработки в парах ГА при комнатной температуре 2 ч. Адгезия полученных мембран к поверхности в этом случае составляла

Таблица 2
Относительная активность иммобилизованного трипсина, (% от свободного фермента)

Время инкубации в парах ГА, ч	Соотношение концентраций трипсин:БСА в мембране		
	1:4	1:1	4:1
0,5	4,0	1,5	1,5
1,0	17,0	1,5	2,0
2,0	28,0	3,0	2,5
2,5	23,0	—	—

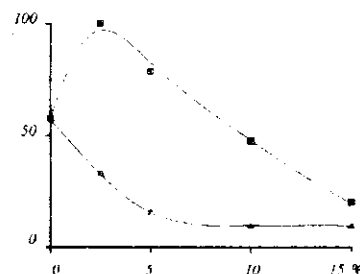
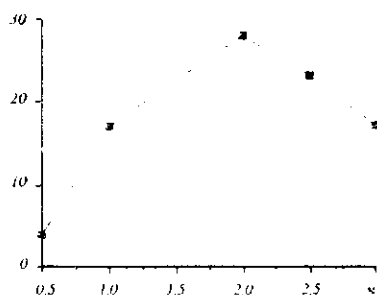


Рис. 1. Зависимость относительной активности иммобилизованного трипсина от времени инкубации в парах ГА. Здесь и на рис. 2 по оси ординат — относительная активность, %
Рис. 2. Влияние на относительную активность иммобилизованного трипсина различных концентраций стабилизирующих добавок: 1 — глицерина; 2 — сахарозы

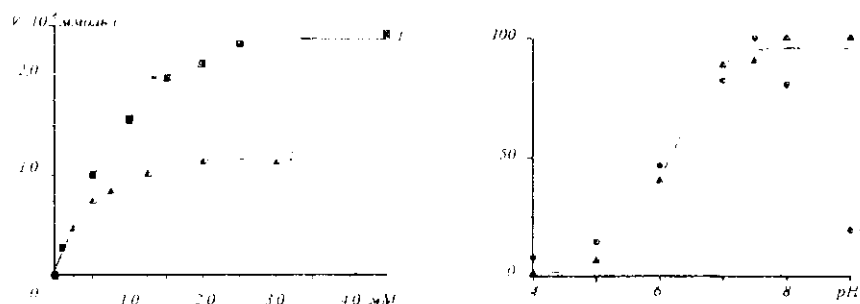


Рис. 3. Зависимость начальной скорости каталитической реакции трипсина от концентрации субстрата БАПНА: 1 — для свободного фермента; 2 — для иммобилизованного фермента
Рис. 4. Зависимость относительной активности трипсина от pH буфера: 1 — для свободного фермента; 2 — для иммобилизованного. По оси ординат — относительная активность, %

0,5 отн. ед. Введение в мембрану стабилизирующих добавок (глицерина в концентрации 2,0—2,5 %) повышало адгезию мембран к поверхности в 2 раза, активность иммобилизованного фермента — в 1,5—1,7 раза (рис. 2, кривая 1). Значительное улучшение структуры мембран при введении глицерина показали фотографии, сделанные с помощью электронной микроскопии. Введение глицерина в исходную смесь для иммобилизации, по-видимому, предотвращает быстрое высыхание капли, наносимой на пластину, что способствует более равномерному протеканию реакции в парах ГА и получению гомогенной структуры мембраны. При дальнейшем увеличении содержания глицерина (до 10—15 %) время высушивания мембраны после обработки в парах ГА увеличивалось до 4—6 ч, а активность иммобилизованного трипсина значительно падала. Введение сахарозы в качестве стабилизирующей добавки не дало положительных результатов (рис. 2, кривая 2).

На рис. 3 представлены кривые зависимости активности фермента от концентрации субстрата БАПНА, полученные для свободного (1) и связанного (2) трипсина. В обоих случаях насыщение субстратом наблюдалось при концентрациях свыше 1 мМ. Рассчитанные значения кажущейся K_m для иммобилизованного и свободного фермента, характеризующие сродство трипсина к субстрату БАПНА в данных условиях, несущественно отличались между собой и находились в пределах 0,7—1,0 мМ, что может свидетельствовать о сохранении конформации трипсина в мембране.

Для сравнения свойств свободного и иммобилизованного фермента в условиях влияния факторов, характерных для биологических жидкостей, были сняты зависимости их активности от pH, ионной силы и буферной емкости раствора.

Результаты изучения зависимости активности свободного и связанного трипсина от pH представлены на рис. 4 (кривые 1 и 2 соответственно). Как можно видеть, pH-зависимость иммобилизованного фермента имеет колоколообразную форму, в то время как для свободного трипсина характерна сигмоидальная форма кривой. pH-оптимум иммобилизованного фермента находится в пределах 7,5—7,8. Причины изменения формы pH-зависимости нами специально не изучались.

Анализ зависимости активности свободного и связанного ферментов от буферной емкости (рис. 5) и ионной силы (рис. 6) рабочего буфера показал, что, в отличие от свободного фермента, активность которого практически не менялась с ростом концентрации ионной силы фосфатного буфера, активность связанного трипсина в этих условиях существенно падала. Такой эффект наблюдался ранее для глюкозооксидазы и уреазы [10]. Причиной

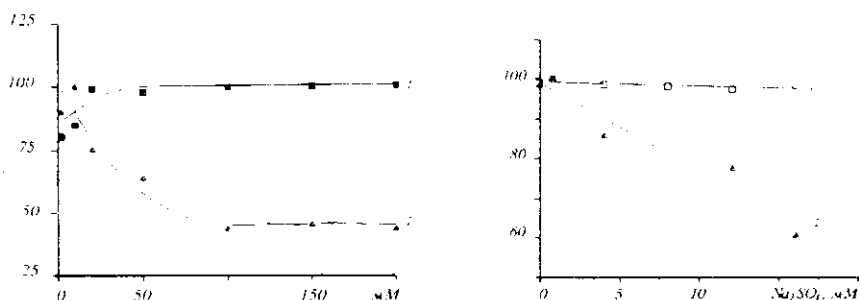


Рис. 5. Зависимость относительной активности трипсина от концентрации фосфатного буфера (рН 7,5): 1 — для свободного фермента; 2 — для иммобилизованного. Здесь и на рис. 6 по оси ординат — относительная активность, %

Рис. 6. Зависимость относительной активности трипсина от концентрации Na_2SO_4 в буфере: 1 — для свободного фермента; 2 — для иммобилизованного.

падения активности фермента в этих случаях является изменение проницаемости мембран, поскольку увеличение концентрации и ионной силы буфера препятствует ее набуханию.

Одной из основных характеристик предполагаемого биосенсора является его стабильность в течение определенного времени. В связи с этим было проанализировано изменение активности иммобилизованного трипсина во времени при хранении в различных условиях в сухом виде при комнатной температуре и при 4°C , под слоем глицерина (4°C) и в 20 мМ фосфатном буфере (4°C) (рис. 7, кривые 1—4 соответственно). Как видно из представленных результатов, активность иммобилизованного трипсина в последнем случае практически не изменялась в течение 30 дней, в то время как при хранении в сухом виде или под слоем глицерина она падала в течение 10—20 дней.

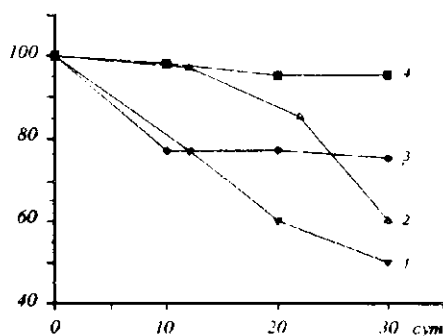


Рис. 7. Изменение относительной активности иммобилизованного трипсина во времени при хранении в различных условиях: 1 — в сухом виде при комнатной температуре; 2 — в сухом виде при 4°C ; 3 — под слоем глицерина при 4°C ; 4 — в 20 мМ фосфатном буфере при 4°C . По оси ординат — относительная активность, %

Изложенные результаты позволяют сделать вывод о возможности включения трипсина в состав энзимосенсора путем иммобилизации в белковой мембране в парах ГА, так как полученные мембраны обладают достаточно высокой активностью без существенного изменения свойств свободного трипсина (K_m , рН-оптимум), удовлетворительной адгезией к кремниевым поверхностям, а также стабильны в течение месяца. В то же время показано, что активность иммобилизованного трипсина существенно зависит от ионной силы и буферной емкости рабочего раствора. Таким образом, при включении иммобилизованного трипсина в состав энзимобиосенсора для проведения количественных определений концентраций субстратов необходимо подобрать оптимальные условия для проведения измерений.

О. А. Белоиван, О. П. Солдаткин, М. Ф. Стародуб, Г. В. Ельська

Протеолитический биосенсор на основе pH-чувливых полевых транзисторів.

1. Вивчення порівняльних характеристик нативного і іммобілізованого трипсину для створення ензимобіосенсора

Резюме

Проаналізовано методи іммобілізації трипсину з точки зору сенсорної технології. Здійснено іммобілізацію трипсину на напівпровідникову поверхню шляхом поперечної зшивки у білковій мембрані в парах глутарового альдегіду (ГА). Підібрано оптимальні умови цього процесу: співвідношення трипсин:БСА — 1 : 4; час інкубації в парах ГА 2 год при кімнатній температурі. Вивчено вплив стабілізуючих додатків гліцерину і сахарози на характеристики мембрани. Додавання 2,0—2,5 % гліцерину підвищує активність мембран і рівень адгезії до поверхні. Проведено порівняльне дослідження каталітичних характеристик вільного і іммобілізованого трипсину, таких як K_m , залежність активності ферменту від pH, буферної ємності та іонної сили аналізованого розчину. Результати обговорюються з позиції можливого використання отриманих мембран як чутливого елемента протеолітичного біосенсора.

O. A. Beloivan, A. P. Soldatkin, N. F. Starodub, A. V. El'skaya

A proteolytic biosensor based on a pH-sensitive field effect transistor.

1. The comparative investigation of native and immobilized trypsin

S u m m a r y

The immobilization of trypsin on semiconductor surface has been made by crosslinking with bovin serum albumin in saturated glutaraldehyde (GA) vapours. The optimal conditions of this process were as following: the ratio of trypsin:BSA — 1 : 4, and incubation time in GA vapours — 2 h at room temperature. The influence of different concentrations of sucrose and glycerol on membrane characteristics has also been investigated. Addition of 2,0—2,5 % of glycerol increase membrane activity and its adhesion level to the surface. The catalytical characteristics of free and immobilized trypsin have been compared such as K_m , dependence of the enzyme activity on pH, buffer capacity, ionic strength of analysing solution. The possibility to use trypsin membrane as sensitive element of proteolytic biosensor has been discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Практическая химия белка* / Под ред. А. Дарбре.—М.: Мир, 1989.—621 с.
2. *Диксон М., Узбб Э. Ферменты.*—М.: Мир, 1982.—Т. 1.—389 с.
3. *Тарасевич М. Р., Богдановская В. А.* Модифицированные электроды и сенсоры на их основе // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1989.—34, № 3.—С. 349.
4. *Immobilized enzymes* / Ed. K. Mosbach // Meth. Enzymol.—1976.—44.—P. 661—663.
5. *Fu H., Anzai J., Osa T., Masuo T.* Proteolytic enzyme sensors using an ion-sensitive field effect transistor // Chem. Pharm. Bull.—1988.—36, N 3.—P. 1190.
6. *Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы* / Под ред. Дж. Вудворда.—М.: Мир, 1988.—215 с.
7. *Солдаткин А. П., Бубряк О. А., Стародуб Н. Ф. и др.* Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // Электрохимия.—1993.—29, N 3.—С. 316—317.
8. *Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A. et al.* Glucose sensitive field effect transistor with additional Nafion membrane // Anal. Chim. Acta.—1993.—283.—P. 696.
9. *Kimura J., Kawana Y., Kuriyata I.* An immobilized enzyme membrane fabrication method using an ink jet nozzle // Biosensors.—1988.—4.—P. 41—52.
10. *Стародуб Н. Ф., Хусточка Л. Н., Лазаренко А. В. и др.* Интеграция биологического материала в электрохимические биосенсорные устройства // Журн. аналит. химии.— 1990.—45, № 7.—С. 1433—1440
11. *Донсон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика.—М.: Мир, 1991.—543 с.
12. *Гороновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф.* Краткий справочник по химии.— Киев: Наук. думка, 1965.—835 с.