

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ОПТИМАЛЬНІ УМОВИ РОБОТИ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЇ КИСЛОТИ

І. С. Кучеренко^{1, 2}
О. О. Солдаткін^{1, 2}
Д. Ю. Дідух^{1, 2}
О. П. Солдаткін^{1, 2}

¹Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ
²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна

E-mail: kucherenko.i.s@gmail.com

Отримано 01.07.2013

Досліджено аналітичні характеристики амперометричного ензиматичного біосенсора для визначення аденозинтрифосфорної кислоти. Біосенсор створено на основі іммобілізованих ензимів (глюкозооксидази та гексокінази) як біоселективного елемента та дискових платинових електродів як амперометричних перетворювачів біохімічного сигналу в електричний. Визначено оптимальні умови іммобілізації ензимів, функціонування запропонованого біосенсора, зокрема досліджено його роботу в різних буферних розчинах та показано, що, змінюючи склад аналізованого розчину, можна модулювати операційні характеристики біосенсора залежно від завдань, що покладаються на нього. Показано високу відтворюваність відгуків біосенсора на глюкозу і аденозинтрифосфорну кислоту впродовж дня роботи, а також відтворюваність процесу його виготовлення. Запропонований біосенсор надалі може бути використаний для аналізу вмісту глюкози та аденозинтрифосфорної кислоти у водних біологічних зразках.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, іммобілізовані ензими, глюкозооксидаза, гексокіназа, аденозинтрифосфорна кислота.

Моніторинг концентрації біологічно активних речовин у живому організмі та в лабораторних зразках є актуальним завданням сучасної молекулярної біології та біотехнології. До біологічно активних речовин належать макроергічні сполуки, зокрема аденозин-5'-трифосфат (АТР). АТР — це ключова макроергічна молекула в клітинах будь-якого організму. АТР використовується під час синтезу практично всіх необхідних клітинних сполук, таких як протеїни, нуклеотиди, нуклеїнові та жирні кислоти. Тому визначення вмісту АТР дає змогу оцінити енергетичний стан клітин і тканин. Визначення АТР може бути також корисним для дослідження біохімічних процесів, у яких він бере участь, а саме: регулювання скорочення м'язів і агрегація тромбоцитів [1], підтримання судинного тону, нейротрансмісія та регуляція діяльності нервової системи [2, 3]. Зміна концентрації АТР може впливати на вивільнення трансмітерів, синаптичну пластичність, взаємодію нейроглії, цикли сну і не-

спання, респіраторні та локомоторні ритми; викликати тривогу, депресію та агресію [3].

Окрім того, визначення концентрації АТР може бути ефективно використано в харчовій промисловості, оскільки він є маркером зараження продуктів мікроскопічними грибами, а також у медицині під час розроблення ліків, зокрема інгібіторів кіназ [4].

Сучасні стандартні методи високоточного визначення АТР, зокрема спектрофотометрія та рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу, складного й дорогого обладнання [5, 6]. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність у досить складній попередній підготовці проб для аналізу. Флуоресцентні, біо- та хемолюмінесцентні методи позбавлені частини зазначених недоліків, проте часто не відповідають умовам моніторингу АТР [7–9].

Першим методом визначення концентрації АТР був люциферазний. Він полягає у вимірюванні світла, яке випромінюється

ензимом люциферазою під час розщеплення АТР [10]. Цей метод селективний та відносно чутливий, однак недоліком його є обмежені можливості щодо вимірювань у режимі реального часу та *in vivo*.

З огляду на вищезазначене актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту АТР у досліджуваних зразках. Зокрема, біосенсори завдяки своїй селективності, відсутності потреби в пробопідготовці та високій швидкості аналізу найкраще підходять для визначення концентрації АТР. За допомогою біосенсорів, чутливих до АТР, різні біохімічні процеси можуть бути безпосередньо вивчені та візуалізовані.

Існує низка лабораторних прототипів біосенсорів для визначення АТР, в основі яких лежать різні ензиматичні реакції [11–17]. Зокрема, для створення біосенсорів, чутливих до АТР, було запропоновано ензими H^+ -АТРазу [11] та апіразу (АТР-дифосфогідролазу) [12]. Недоліками цих біосенсорів є відносно низька чутливість до АТР та залежність роботи біосенсорів від іонної сили [11, 12], що унеможливує їх застосування для аналізу біологічних рідин з високою іонною силою та мікромолярним вмістом АТР. Окрім цього, відомі біосенсори, в яких було використано ензимні системи: гліцеролкіназа–гліцерол-3-фосфатоксидаза [13] та глюкозооксидаза–гексокіназа [4, 14–17]. Головним недоліком біосенсора на основі гліцеролкінази та гліцерол-3-фосфатоксидази, описаного в [13], є низька селективність. Для інших біосенсорів селективність і вплив інтерферуючих речовин було досліджено недостатньо [14–17].

Ми розробили новий високочутливий та високоселективний амперометричний біосенсор на основі двох ензимів: глюкозооксидази і гексокінази, коїмобілізованих на поверхню дискового платиного електрода. Було детально досліджено і проаналізовано аналітичні характеристики біосенсора для визначення концентрації АТР.

У подальшому цей біосенсор планується використати як складовий елемент масиву цих приладів для визначення одночасно кількох біологічно активних речовин.

Матеріали і методи

У роботі було використано ензими гексокіназу (ГЕК, ЕС 2.7.1.1) із *Saccharomyces cerevisiae* з активністю 30,6 ОА/мг фірми Sigma-Aldrich (Німеччина) та глюкозооксидазу (ГОД, ЕС 1.1.3.4) із *Aspergillus niger*

з активністю 272 ОА/мг фірми Genzyme (Великобританія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), глюкозу, АТР, гліцерол, НЕРЕС та 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було одержано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Трис, KH_2PO_4 та інші реактиви були вітчизняного виробництва і мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

Конструкція амперометричних перетворювачів

Як амперометричні перетворювачі застосовували платинові дискові електроди власного виробництва. Створюючи їх, платиновий дріт діаметром 0,4 мм і завдовжки 3 мм спочатку запаювали в кінцевій частині скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий торець дроту слугував робочою поверхнею перетворювача. Потім платиновий дріт за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда з'єднували з провідником, розміщеним усередині капіляра. На другому кінці провідника приєднували контактну площадку для підключення до вимірювальної установки. Робочу поверхню електродів одержували шліфуванням із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,1 мкм та 0,05 мкм) та обробляли спиртом перед іммобілізацією біоселективного елемента. Періодично електродну поверхню поновлювали за допомогою такого самого шліфування.

Виготовлення біоселективних елементів

Біоселективні елементи біосенсорів одержували ковалентною іммобілізацією ензимів і допоміжних речовин на поверхню амперометричного перетворювача. Вихідний розчин містив 5% (тут і далі — масова частка) ГОД, 5% ГЕК, 3% БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10%-м гліцеролом. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 0,4%-м водним розчином глутарового альдегіду (зшивального агента) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів і висушували протягом 40 хв на повітрі за кімнатної температури. Потім електроди занурювали у робочий буфер на 10 хв для вимивання незв'язаних компонентів біоселективних елементів та надлишку глутарового альдегіду.

Методика вимірювання

У роботі використовували триелектродну схему амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний

платиновий електрод та електрод порівняння (Ag/AgCl) підключали до потенціостата PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-канальний пристрій (CH-8 multiplexer) того самого виробника, що підключався до потенціостата, давав змогу одержувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів, проте зазвичай до нього були підключені 2–3 робочі електроди (через невеликий об'єм робочої комірки). Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами у процесі вимірювання була однаковою і становила приблизно 5 мм. Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 3,5 мл за постійного перемішування та потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Робочим буфером слугував 25 мМ HEPES з pH 7,4, до якого було додано $Mg(NO_3)_2$ до концентрації 2 мМ; у частині експериментів застосовували також фосфатний та трис-буфер. Концентрацію субстратів у робочій комірці задавали додаванням аліквот концентрованих розчинів субстратів (50 мМ і 500 мМ глюкози та 50 мМ АТР). Усі дослідження проводили у трьох повторах.

Результати та обговорення

Попередня підготовка перетворювачів до роботи

Робота амперометричних біосенсорів базується на вимірюванні струму, що проходить через робочий електрод за прикладання відповідного потенціалу. Цей струм формується внаслідок окиснювально-відновних реакцій на поверхні електрода. У нашій роботі прикладання потенціалу спричиняло окиснення пероксиду водню, продукту ензиматичної реакції окиснення глюкози, на робочому електроді. З другого боку, за наявності в розчині інших електроактивних сполук, вони теж окиснюватимуться на електроді та призводитимуть до похибки у вимірюваннях. Тому на першому етапі роботи було поліпшено селективність амперометричного електрода шляхом нанесення мембрани з поліфенілендіаміну (ПФД) за [18]. Ця мембрана утворює пори, розмір яких є достатнім для проходження пероксиду водню до поверхні електрода і недостатнім для проходження більших за розміром речовин. Для формування ПФД мембрани триелектродної системи з чистим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин м-фенілендіаміну, після чого одержували 4–5 циклічних вольтамперограм (рис. 1). Четверта та п'ята вольтам-

перограми майже не відрізнялися одна від одної, що свідчило про закінчення формування шару ПФД на поверхні робочого електрода. Форма циклічних вольтамперограм, отриманих на використаних у нашій роботі електродах, цілком збігалася з наведеними в першоджерелі [18]. Після цього поверх ПФД-мембрани іммобілізували біоселективні елементи на основі ензимів ГОД та ГЕК.

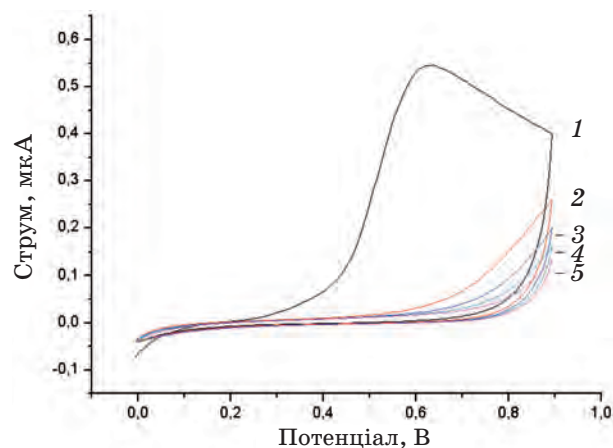


Рис. 1. Циклічні вольтамперограми, одержані в 5 мМ м-фенілендіаміні з використанням платинових дискових електродів.

Фенілендіамін розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буфері, pH 7,4. Початковий потенціал — 0 В, кінцевий +0,9 В, швидкість зміни потенціалу — 20 мВ/с, крок зміни потенціалу — 5 мВ

Для підтвердження поліпшення селективності модифікованого перетворювача було перевірено чутливість електродів до інтерферуючих речовин до та після нанесення ПФД-мембрани. Інтерферентами слугували дофамін (20 мкМ), цистеїн (100 мкМ), аскорбінова кислота (500 мкМ), сечова кислота (100 мкМ) та парацетамол (100 мкМ). Ці речовини є досить поширеними у біологічних зразках і здатні окиснюватись за прикладання потенціалу до амперометричного перетворювача. Після нанесення ПФД-мембрани відгуки біосенсора на інтерференти зникли зовсім або зменшилися до незначних розмірів, при цьому чутливість перетворювача до пероксиду водню (50 мкМ) майже не змінилась (рис. 2).

Інтенсивність окиснення пероксиду водню на платиновому електроді, а отже, і величина відгуку біосенсора залежать від прикладеного до електрода потенціалу. Тому на наступному етапі роботи досліджували, в якому діапазоні потенціалів здатен функціонувати біосенсор. Для цього на електроді

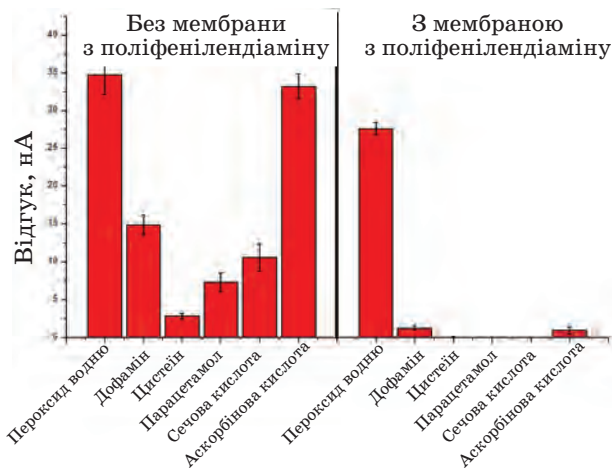


Рис. 2. Відгуки амперометричного перетворювача без ПФД-мембрани та з нею на деякі електроактивні речовини порівняно з відгуками на пероксид водню.

Концентрацію речовин наведено в тексті. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl-електрода порівняння, $P < 0,05$

з нанесеним біоселективним елементом було одержано циклічні вольтамперограми за відсутності та за наявності в розчині глюкози (рис. 3). Глюкоза розщеплювалась ГОД, наявною в складі біоселективного елемента біосенсора, що призводило до утворення пероксиду водню. Саме він і продукував струм через електрод. Найбільшу різницю між вольтамперограмами спостерігали за потенціалів від +0,4 В до +0,9 В, що свідчить про достатньо широкий діапазон можливих робочих потенціалів. Для подальшої роботи використовували потенціал +0,6 В відносно Ag/AgCl-електрода порівняння, який є стандартним для безмедіаторних амперометричних біосенсорів, сигнал яких формується за рахунок окиснення пероксиду водню [19]. Також було одержано вольтамперограми на чистих електродах (рис. 3, крива 1), які практично не відрізнялися від таких електродів із біоселективним елементом. Це свідчить, що нанесення біоселективного елемента не змінювало електрохімічні властивості електродів.

Принцип роботи біосенсора для визначення АТР

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення АТР лежать дві ензиматичні реакції, що одночасно відбуваються в біоселективній мембрані, а також реакція розкладу пероксиду водню на електроді за прикладання необхідного потенціалу, яка безпосередньо реєструється амперометричним перетворювачем:

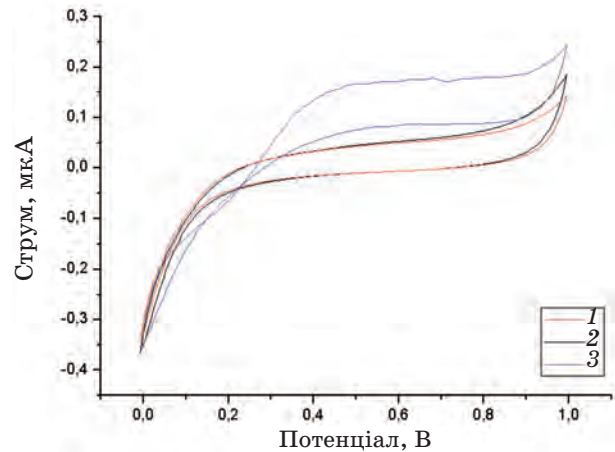
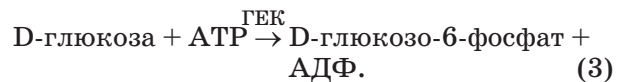
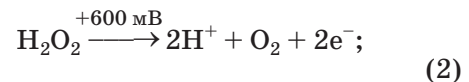
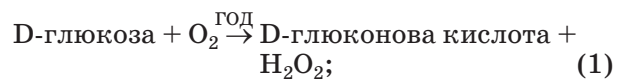


Рис. 3. Циклічні вольтамперограми, одержані на дискових платинових електродах: без біоселективної мембрани (1); з нанесеною біоселективною мембраною (2); з мембраною і додаванням до розчину 500 мкМ глюкози (3). Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4



За наявності в розчині глюкози і відсутності АТР у біоселективній мембрані біосенсора задіяна лише ГОД, тому відбуваються реакції (1) і (2). Відгук біосенсора в цьому разі пропорційний концентрації глюкози. Після додавання до робочого розчину АТР у мембрані розпочинається реакція (3) за участю ГЕК, яка зменшує локальну концентрацію глюкози у біоселективній мембрані, і, як наслідок, відгук біосенсора на глюкозу зменшується пропорційно концентрації АТР.

Вибір тривалості іммобілізації біоселективного елемента

Одним із ключових етапів створення біосенсора є іммобілізація біологічного матеріалу на поверхню перетворювача. У нашому випадку іммобілізували ензими шляхом зшивання глутаровим альдегідом. При цьому утворюються ковалентні зв'язки між ензимами та допоміжними речовинами, що призводить до їх іммобілізації та зменшення

активності. Тому на наступному етапі роботи ми провели перевірку роботи біосенсорів за різної тривалості іммобілізації біоселективного елемента (від 20 до 50 хв). Тривалість іммобілізації впливає на низку параметрів, зокрема на швидкість відгуку біосенсора та його стабільність під час зберігання. Передусім нас цікавила чутливість біосенсора до АТР, яку вимірювали як концентрацію АТР, що дає відгук, утричі більший за величину шуму базової лінії. Узагальнені дані стосовно тривалості іммобілізації наведено в табл. 1. Чутливість до АТР була вищою за іммобілізації ензимів протягом 30 та 40 хв, тоді ж спостерігали і найвищі відгуки біосенсорів на глюкозу та АТР. У подальшому було вирішено проводити іммобілізацію тривалістю 40 хв для більш надійної іммобілізації ензимів.

Вибір робочого буфера

Склад робочого буфера певною мірою може впливати на роботу біосенсора, оскільки активність ензимів залежить від складу розчину, в якому вони містяться. Тому в цьому дослідженні порівнювали роботу біосенсора на основі ГОД та ГЕК у різних буферних системах: фосфатному, трис та HEPES. Усі буфери були приготовані з однаковою молярністю та рН (25 мМ, рН 7,4); для доведення рН використовували HCl та NaOH. В усі буферні розчини було додано $Mg(NO_3)_2$ до концентрації 2 мМ, потрібної для ефективної роботи гексокінази. Основними характеристиками, за якими проводили порівняння роботи біосенсора в різних буферних розчинах, обрали величини відгуків біосенсора на глюкозу (50 мкМ) та АТР (50 мкМ), дрейф базової лінії, рівень шуму (середньоквадратичне відхилення) базової лінії та межу визначення АТР. Відгуки біосенсора у трьох буферних розчинах наведено на рис. 4, а узагальнені результати — у табл. 2. Аби наведені відгуки не дублювали дані таблиці, їх було зафіксовано іншим біосенсором за концентрації глюкози 75 мкМ і АТР 50 мкМ. Як

впливає з табл. 2, найбільші відгуки біосенсора на глюкозу спостерігали у фосфатному буфері, найменші — у трис. Із додаванням АТР спостерігали іншу ситуацію — найбільші відгуки біосенсора було одержано в буфері HEPES, а найменші — у фосфатному. Можливою причиною цього ефекту може бути різке зменшення концентрації магнію у фосфатному буфері через утворення малорозчинного фосфату. Максимальною чутливістю біосенсора до АТР також була у буфері HEPES. Оскільки мета даного дослідження — визначення насамперед АТР, а не глюкози, для подальшої роботи як буферний розчин вибрали HEPES.

Було також перевірено вплив буферної ємності на роботу біосенсора шляхом зміни концентрації робочого буфера від 5 до 100 мМ. Зі збільшенням буферної ємності збільшуються також іонна сила розчину та його фонові провідність. Значних змін відгуків біосенсора при цьому не спостерігали, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Це свідчить про можливість використання розробленого нами біосенсора у біологічних розчинах, що характеризуються різними буферною ємністю та іонною силою.

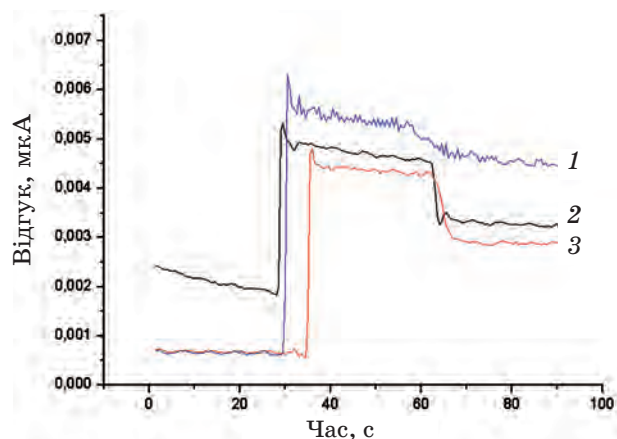


Рис. 4. Порівняння відгуків біосенсора в різних буферних розчинах: фосфатному (1), трис (2) та HEPES (3). Спочатку до робочої комірки додавали глюкозу (75 мкМ), а потім — АТР (50 мкМ)

Таблиця 1. Порівняння характеристик біосенсорів, одержаних за різної тривалості іммобілізації біоселективного елемента

Характеристики біосенсора	Тривалість іммобілізації*			
	50 хв	40 хв	30 хв	20 хв
Відгук на 50 мкМ глюкози, нА	6,3 ± 1,6	6,7 ± 1,0	6,5 ± 1,6	4,8 ± 2,5
Відгук на 25 мкМ АТР, нА	0,7 ± 0,2	1 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,2
Чутливість до АТР, мкМ	9,2 ± 2,6	9 ± 2,3	6,7 ± 1,8	10,4 ± 2,9

Примітка. Тут і далі: * — $P < 0,05$.

Таблиця 2. Порівняння характеристик біосенсора під час роботи в різних буферних розчинах

№	Характеристики біосенсора	Робочий буфер		
		HEPES	трис	фосфатний
1	Величина відгуку на 50 мкМ глюкози, нА	2,9 ± 0,6*	2,3 ± 0,6*	4,4 ± 0,6*
2	Величина відгуку на 50 мкМ АТР, нА	1,5 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	0,9 ± 0,2*
3	Відносна величина відгуку на 50 мкМ АТР, у відсотках від відгуку на глюкозу	52	52	21
4	Шум відгуку на глюкозу, нА	0,05	0,04	0,08
5	Дрейф базової лінії за 20 с, нА	0,16	0,26	0,24
6	Чутливість до АТР, мкМ	4,6	6,6	13

Підбір концентрації магнію

Для роботи гексокінази, що входить до складу біоселективного елемента біосенсора для визначення АТР, потрібна наявність іонів Mg^{2+} у робочому буфері (магній стабілізує молекулу АТР і виступає активатором ГЕК). Для підбору оптимальної концентрації Mg^{2+} у робочому буфері було перевірено роботу біосенсора за концентрації Mg^{2+} від 0,5 мМ до 3 мМ. Відгуки біосенсора на додавання глюкози практично не залежали від концентрації магнію, оскільки ГОД для каталізу не потребує іонів магнію. Відгуки біосенсора на АТР, як і очікували, збільшувалися за концентрації магнію від 0,5 мМ до 2 мМ — спостерігали прямо пропорційне зростання відгуків біосенсора на АТР, а додавання більше 2 мМ солі магнію вже не призводило до суттєвого збільшення. Тому в подальшій роботі до робочого буфера додавали 2 мМ Mg^{2+} (у вигляді нітрату магнію).

Вплив концентрації глюкози на лінійний діапазон вимірювання АТР

Як було описано вище, вимірювання концентрації АТР біензимним біосенсором базується на конкуренції між ГОД і ГЕК за глюкозу. Принциповим є те, що вимірювати АТР можна за будь-якої концентрації глюкози, однак чим більше глюкози в розчині, тим меншим буде відносно падіння відгуку біосенсора з додаванням АТР (на фоні значного відгуку біосенсора на глюкозу); шум сигналу також збільшується пропорційно кількості глюкози. Із цих причин було одержано калібрувальні криві для визначення АТР за концентрації глюкози від 10 до 250 мкМ (рис. 5). Як видно, зменшення концентрації глюкози в розчині призводить до звуження лінійного діапазону роботи біосенсора під час визначення АТР, а також до збільшення відгуку біосенсора (а отже, і чутливості) на додавання АТР у невеликій

концентрації. Тому для визначення високої концентрації АТР (200–300 мкМ і більше) доцільно додавати до розчину велику концентрацію глюкози (250 мкМ), тимчасом як меншу концентрацію АТР бажано вимірювати за концентрації глюкози від 10 мкМ до 100 мкМ.

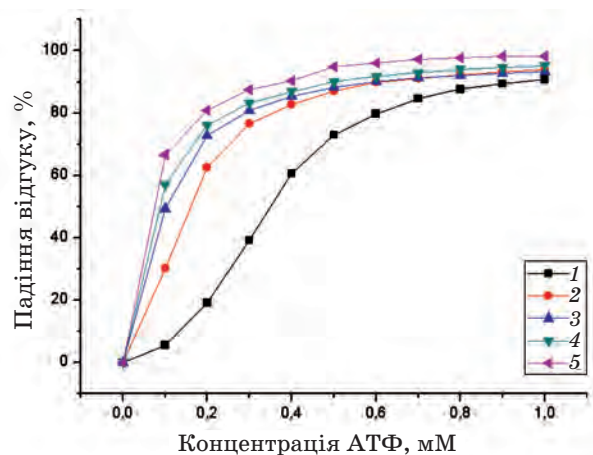


Рис. 5. Калібрувальні криві біосенсора для визначення АТР, одержані за концентрації глюкози:

250 мкМ (1); 100 мкМ (2); 50 мкМ (3); 25 мкМ (4); 10 мкМ (5). Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES-буфері, рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Відтворюваність відгуків біосенсора на АТР та глюкозу

На наступному етапі роботи було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів упродовж декількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання глюкози та АТР тривало 7–10 хв (однієї глюкози — 3–5 хв), проміжок між вимірюваннями становив близько 10 хв; за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на глюкозу та АТР подано на рис. 6, А. Помітного падіння відгуків на обидві речовини за 10 вимірювань не відбувалось; відносно середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу становило 3–6%, а відгуків на АТР — 8–12% (залежно від конкретного біосенсора). Більша розбіжність відгуків під час вимірювання АТР порівняно з глюкозою пояснюється тим, що відгук на АТР формується за рахунок конкуренції між двома ензимами (ГОД і ГЕК), які використовують два субстрати (глюкозу та АТР), тоді як відгук на глюкозу формує лише один фермент (ГОД) на один субстрат (глюкозу).

Також було підраховано, наскільки змінюється чутливість до АТР під час роботи біосенсора упродовж дня (рис. 6, Б). Найбільшу чутливість спостерігали на початку роботи біосенсора (одразу після іммобілізації ензимів), а за безперервної роботи біосенсора чутливість дещо погіршувалась, однак підвищення було несуттєвим.

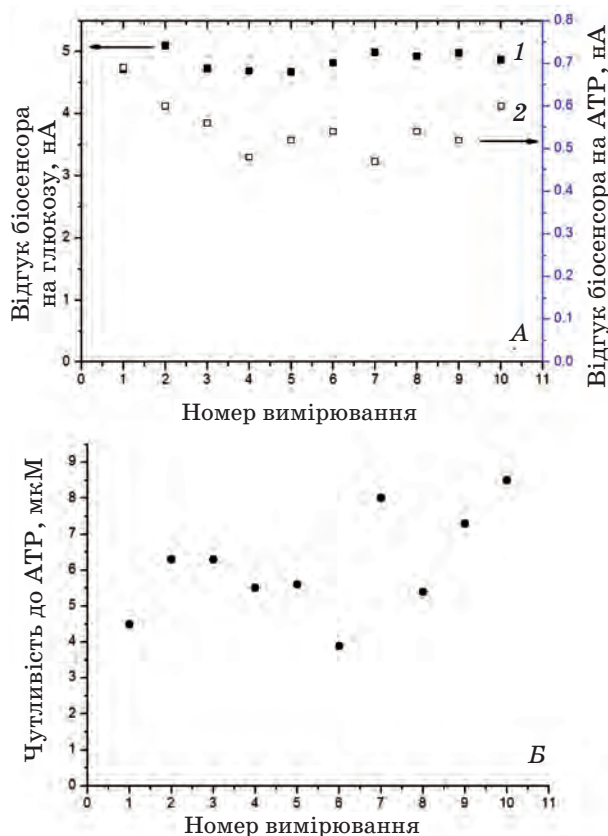


Рис. 6. Відтворюваність відгуків біосенсора: на глюкозу (А, 1) та АТР (А, 2) і зміна чутливості біосенсора до АТР (Б) упродовж кількох годин. Концентрація глюкози — 50 мкМ, АТР — 25 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння

Відтворюваність процесу виготовлення біосенсорів

Відтворюваність приготування біосенсорів є важливою у разі їх масового виробництва. Цей параметр визначали шляхом проведення різних іммобілізацій біоселективних елементів на різні перетворювачі, після чого одержували відгуки біосенсорів на сталу концентрацію глюкози (100 мкМ) і за цієї концентрації одержували калібрувальні криві для визначення АТР. Відгуки одержаних біосенсорів на глюкозу наведено на рис. 7, А, а калібрувальні криві для визначення АТР — на рис. 7, Б.

Відносно стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів на глюкозу становило 14% ($P < 0,05$), що є допустимим. Калібрувальні криві для визначення АТР усіх біосенсорів мали схожу форму і однаковий діапазон концентрацій. Хоча величина відгуків на АТР різних біосенсорів відрізнялася, це було несуттєвим, оскільки кожен біосенсор перед використанням калібрували.

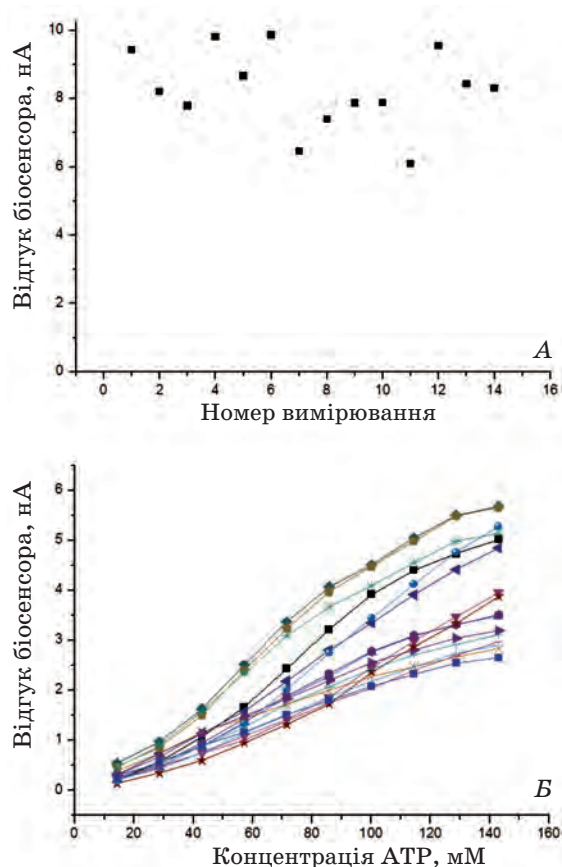


Рис. 7. Відгуки на глюкозу (А) та калібрувальні криві для визначення АТР (Б), одержані різними біосенсорами.

Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння

Таким чином, розроблено амперометричний біосенсор для визначення АТФ та глюкози. З'ясовано, що запропонований біосенсор може працювати в діапазоні потенціалів від +0,4 В до +0,9 В. Оптимальний час іммобілізації ензимів становив 40 хв. Досліджено роботу біосенсора у трьох буферних розчинах, оптимальні характеристики при визначенні АТФ спостерігали в буфері НЕРЕС. Показано, що, змінюючи склад аналізованого розчину, можна досягати різноманітних операційних характеристик біосенсора залежно від поставлених завдань. Так, зі збільшенням концентрації глюкози в аналізованому розчині відбувається розширення діапазону визначення АТФ і водночас зменшується чутливість біосенсора до невеликої концентрації АТФ. Біосенсор характеризується достатньою відтворюваністю відгуків на глюкозу (3–6%) і АТФ (8–12%), а також процесу виготовлення біосенсорів. Розроблений біо-

сенсор планується використовувати для створення масиву аналогічних приладів для одночасного визначення АТФ та інших речовин у водних зразках.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

Автори вдячні за фінансову підтримку НДР проектів «Розробка біосенсорних тест-систем та підходи до покращення їхніх аналітичних характеристик» та «Розробка електрохімічних і фотохімічних біосенсорів з використанням мембран на основі хлоропластів і ферментів» від Державного агентства з питань науки, інновації та інформатизації України.

REFERENCES

1. Gourine, A. V., Llaudet E., Dale N., Spyer K. M. Release of ATP in the Ventral Medulla during Hypoxia in Rats: Role in Hypoxic Ventilatory Response. *J. Neurosci.* 2005, V. 25, 1211–1218.
2. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, V. 27, 166–176.
3. Frenguelli B. G., Wigmore G., Llaudet E., Dale N. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. *J. Neurochem.* 2007, V. 101, 1400–1413.
4. Soldatkin O. O., Schuvailo O. M., Marinesco S., Cesputiglio R., Soldatkin A. P. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection. *Talanta.* 2009, V. 78, 1023–1028.
5. Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis (3rd ed.). *Deerfield Beach: VCH Publishers.* 1984, 340 p.
6. Kawamoto Y., Shinozuka K., Kunitomo M., Haginaka J. Determination of ATP and Its Metabolites Released from Rat Caudal Artery by Isocratic Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 1998, V. 262, 33–38.
7. Foy G. P., Pacey G. E. Determination of ATP using chelation-enhanced fluorescence. *Talanta.* 1996, V. 43, 225–232.
8. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Martín J. Determination of ATP via the photochemical generation of hydrogen peroxide using flow injection luminol chemiluminescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, V. 377, 189–194.
9. Miller J. N., Nawawi M. B., Burgess C. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 1992, V. 266, 339–343.
10. Dale N., Frenguelli B. G. Measurement of purine release with microelectrode biosensors. *Purin. Signal.* 2012, V. 8, 27–40.
11. Gotoh M., Tamiya E., Karube I., Kagawa Y. A microsensor for adenosine-5'-triphosphate pH-sensitive field effect transistors. *Anal. Chim. Acta.* 1986, V. 187, 287–291.
12. Migita S., Ozasa K., Tanaka T., Haruyama T. Enzyme-based Field-Effect Transistor for Adenosine Triphosphate (ATP) Sensing. *Anal. Sci.* 2007, V. 23, 45.
13. Llaudet E., Hatz S., Droniou M., Dale N. Microelectrode Biosensor for Real-Time Measurement of ATP in Biological Tissue. *Anal. Chem.* 2005, V. 77, 3267–3273.
14. Scheller F., Pfeiffer D. Glucose oxidase-hexokinase bienzyme electrode sensor for adenosine triphosphate. *Anal. Chim. Acta.* 1980, V. 117, 383–386.
15. Compagnone D., Guilbault G. G. Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP. *Anal. Chim. Acta.* 1997, V. 340, 109–113.
16. Kueng A., Kranz C., Mizaihoff B. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosens. Bioelectr.* 2004, V. 19, 1301–1307.
17. Liu S., Sun Y. Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections. *Biosens. Bioelectr.* 2007, V. 22, 905–911.

18. Killoran S. J., O'Neill R. D. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochim. Acta*. 2008, V. 53, 7303–7312.

19. Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P. Scientific and technological basics of creating miniature electrochemical biosensors. *Kyiv: Naukova dumka*. 2006, 255 p. (In Ukrainian).

ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ РАБОТЫ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

И. С. Кучеренко^{1,2}
А. А. Солдаткин^{1,2}
Д. Ю. Дидух^{1,2}
А. П. Солдаткин^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: kucherenko.i.s@gmail.com

Исследованы аналитические характеристики амперометрического энзиматического биосенсора для определения аденозинтрифосфорной кислоты. Биосенсор создан на основе иммобилизованных энзимов (глюкозооксидазы и гексокиназы) как биоселективного элемента и дисковых платиновых электродов как амперометрических преобразователей биохимического сигнала в электрический. Определены оптимальные условия иммобилизации энзимов, функционирования предложенного биосенсора, в частности исследована его работа в различных буферных растворах и показано, что, изменяя состав анализируемого раствора, можно модулировать операционные характеристики биосенсора в зависимости от возлагаемых на него задач. Показана высокая воспроизводимость отзывает биосенсора на глюкозу и аденозинтрифосфорную кислоту в течение дня работы, а также воспроизводимость процесса его изготовления. Предложенный биосенсор в дальнейшем может быть использован для анализа содержания глюкозы и аденозинтрифосфорной кислоты в водных биологических образцах.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, иммобилизованные энзимы, глюкозооксидаза, гексокиназа, аденозинтрифосфорная кислота.

CHARACTERISTICS AND OPTIMAL WORKING CONDITIONS OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR ADENOSINE TRIPHOSPHATE DETERMINATION

I. S. Kucherenko^{1,2}
O. O. Soldatkin^{1,2}
D. Yu. Didukh^{1,2}
A. P. Soldatkin^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

E-mail: kucherenko.i.s@gmail.com

Analytical characteristics of a biosensor based on glucose oxidase and hexokinase and intended for ATP determination were studied. Platinum disc electrodes were used as amperometric transducers. Range of working potentials for biosensor functioning was shown. An optimal time of enzymes immobilization was determined. Optimal conditions for biosensor functioning during work with biological fluids were selected. Biosensor work in three buffer solutions (PBS, tris and HEPES) was investigated and it was shown that it was possible to obtain various operational characteristics of the biosensor depending on tasks that are assigned to it by varying the composition of sample. Reproducibility of biosensor responses to ATP and glucose during a day and of biosensor preparation was shown. The proposed biosensor can be further used for analysis of glucose and ATP content in water solutions.

Key words: amperometric biosensor, immobilized enzymes, glucose oxidase, hexokinase, adenosine triphosphate.