

# Оптимізація роботи мультибіосенсора при інгібіторному аналізі токсинів

О. О. Солдаткін, О. С. Павлюченко<sup>1</sup>, О. Л. Кукла<sup>1</sup>, В. М. Архипова,  
С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін, Г. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>1</sup>Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України  
Просп. Науки, 41, Київ, Україна, 03028

alex\_sold@yahoo.com

---

*Досліджено роботу високочутливого та селективного мультибіосенсора на основі низки іммобілізованих ферментів як біоселективних елементів та матриці рН-чутливих польових транзисторів як перетворювачів біохімічного сигналу в електричний. Для створення біоселективних елементів мультибіосенсора використано ферменти ацетилхолінестеразу, бутирилхолінестеразу, уреазу, глюкозооксидазу та триферментну систему інвертаза–мутаротаза–глюкозооксидаза, які демонструють високу чутливість до дії токсинів. Визначено оптимальні концентрації субстратів, використані при інгібіторному аналізі, вони становлять для ацетилхоліну 10 мМ, бутирилхоліну – 5 мМ, сечовини – 5 мМ, цукрози – 5 мМ та глюкози – 2 мМ. Час інкубації мультибіосенсора в токсичних розчинах дорівнює 20 хв. Показано, що перехресного впливу субстратів для всіх використаних ферментних систем майже немає. Перевірено також інгібіторну дію окремих токсинів та їхніх сумішей на біоселективні елементи мультибіосенсора.*

*Ключові слова: мультибіосенсор, іммобілізовані ферменти, рН-чутливі польові транзистори, інгібіторний аналіз, токсини.*

---

**Вступ.** Розробка різноманітних біосенсорних приладів для швидкого виявлення та визначення різних токсичних речовин у довкіллі, товарах масового споживання і продуктах харчування є надзвичайно актуальним питанням упродовж останнього десятиліття і одним із основних напрямків розвитку сучасних аналітичних біо/хемотехнологій. Наразі в світі вже розроблено низку монобіосенсорів [1–8] для визначення різних токсичних речовин. Деякі з них створено для прямого аналізу [1–4], інші – для інгібіторного [5–9]. В одній частині біосенсорів як

біоселективні елементи використано ферменти [1–3, 6–9], в другій – мікроорганізми [4, 5]. Для роботи цих біосенсорів застосовували різноманітні типи фізичних перетворювачів і схеми вимірювальних установок. Але селективності одного монобіосенсора часто недостатньо для того, щоб визначити, які речовини і в якій кількості знаходяться у досліджуваному зразку. Зазначені біосенсори можна використовувати лише для визначення однієї токсичної речовини або класу токсичних сполук (загальної токсичності). Тому більшість подібних робіт із створення монобіосенсорів для визначення токсинів завершується перспективою створення мультибіосенсорів. На даному етапі роз-

роблено концепцію мультибіосенсора для використання в екологічному моніторингу та показано принципову можливість його створення [10]. Також існує декілька лабораторних прототипів мультибіосенсорних приладів на основі різних типів перетворювачів з використанням різноманітних біоселективних елементів [11–13]. Але найперспективнішим, на наш погляд, є створення мультибіосенсора, що використовує іммобілізовані ферменти (чи суміші ферментів) та матрицю рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ), на основі інгібіторного аналізу токсичних речовин, який поки ще не застосовувався.

Для створення біоселективних елементів мультибіосенсора запропоновано використати найцікавіші, з точки зору інгібіторного аналізу, ферменти: ацетилхолінестеразу, бутирилхолінестеразу, уреазу, глюкозооксидазу та триферментну систему інвертаза–мутаротаза–глюкозооксидаза. Застосування згаданих ферментів дозволить селективно визначати такі токсичні речовини, як фосфоорганічні та хлороорганічні пестициди, карбаматні гербіциди та іони важких металів. Перші етапи розробки такого мультибіосенсора представлено у нашій роботі [14], де наведено експериментальні дані з вибору спільного, оптимального для перелічених ферментів, методу іммобілізації, підбрано оптимальні умови одночасної роботи біоселективних елементів, перевірено можливості використання мультибіосенсора для прямого аналізу низки субстратів. Ця робота є логічним продовженням попередньої та присвячена використанню і адаптації мультибіосенсора для інгібіторного аналізу.

**Матеріали і методи.** У дослідженнях використано препарати ліофілізованих ферментів: уреазу бобів сої з активністю 31 од. акт/мг фірми «Fluka» (Швейцарія); ацетилхолінестеразу (АцХЕ) електричного вугря з активністю 426 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США); бутирилхолінестеразу (БуХЕ) сироватки крові коня з активністю 13 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie»; глюкозооксидазу (ГОД) *Penicillium vitale* з активністю 130 од. акт/мг фірми «Діагностикум» (Україна); інвертазу пекарських дріжджів з активністю 355 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie»; мута-

ротазу нирки свині з активністю 100 од. акт/мг фірми «Biozyme Laboratories Ltd» (Велика Британія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) також отримано від фірми «Sigma-Aldrich Chemie». Як субстрати використано сечовину, бутирилхолінхлорид (БуХ), ацетилхолінхлорид (АцХ), глюкозу та цукрозу; як інгібітори – водні розчини нітратів важких металів вітчизняного виробництва та трихлорофон [(диметил-2,2,2-трихлор-1-гідроксіетил)-фосфонат] (фосфоорганічний пестицид фірми «Riedel-de-Haen», Швейцарія); карбофуран [2,3-дигідро-2,2-диметилбензофуран-7-іл-N-метилкарбамат] (карбаматний пестицид фірми «Riedel-de-Haen»).

Робочим буфером слугував фосфатний розчин ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ). Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні речовини, використані в роботі, – вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

*Виготовлення біоселективних мембран.* Для виготовлення робочих біоселективних елементів на основі АцХЕ, БуХЕ, уреазу та ГОД готували розчини, які містили суміш 10 % ферменту та 10 % БСА, а для триферментної системи – суміш 6 % інвертази, 6 % мутаротази, 5 % глюкозооксидази та 3 % БСА (далі – триферментний розчин). Наважки ферментів розчиняли у 40 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 20 %-м гліцерином.

Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів брали тільки БСА, кінцева концентрація якого становила 20 %. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів готові розчини (для референтної і робочих мембран) змішували з 2 %-м водним розчином ГА у співвідношенні 1:1. Отримані суміші відразу ж наносили на робочі частини перетворювачів за допомогою мікропіпетки «Eppendorf» (загальним об'ємом 0,1–2,5 мкл) до повного покриття робочої поверхні транзисторів, об'єм кожної з мембран дорівнював близько 0,1 мкл.

Всі мембрани були з однаковим загальним вмістом білка. Після нанесення мембрани висушували протягом 1 год на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани

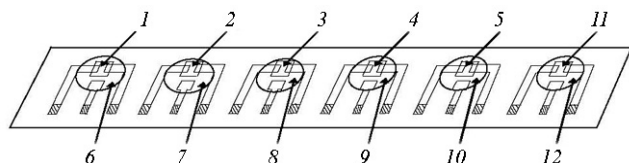


Рис. 1. Сенсорна лінійка з рН-чутливими польовими транзисторами (1–5) з іммобілізованими на поверхнях затворів шарами ферментів (6–10), останнім є референтний транзисторний перетворювач (11) з нейтральним шаром БСА (12)

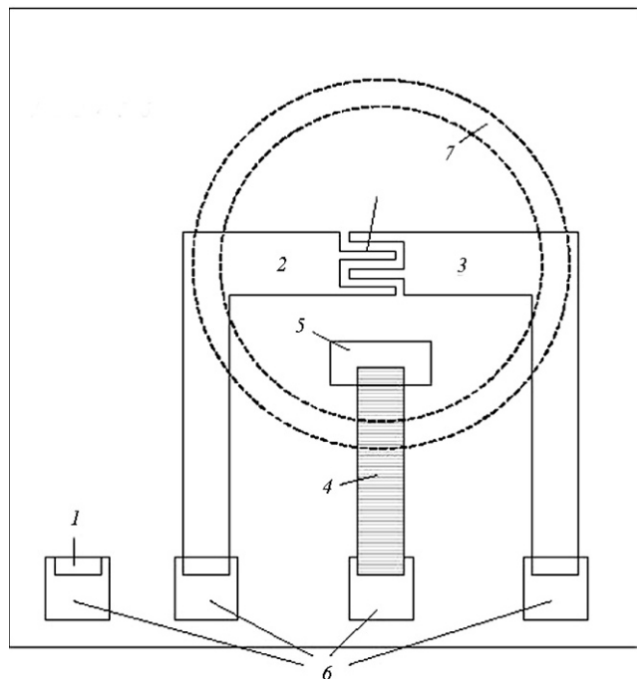


Рис. 2. Топологія окремого рН-ПТ сенсорного елемента: 1 – контакт до  $n$ -підкладки; 2 –  $p^+$ -дифузійні шини від ділянок витоку і стоку транзистора; 3 – ділянка затвора; 4 – вивід до вбудованого електрода порівняння; 5 – шар хлориду срібла; 6 – алюмінієві контактні площини до транзисторних виводів; 7 – місце розташування кільцевого ущільнення для активної області транзистора

відмивали буферним розчином від надлишку незв'язаного ГА.

**Конструкція сенсорних елементів.** Загальною топологічною особливістю створюваних конструкцій рН-польового транзистора (рН-ПТ), орієнтованих на роботу в біохімічних лабораторіях, є необхідність забезпечення вільного і зручного доступу до активної чутливої (затворної) області сенсорних елементів для нанесення на них біомембран. Тому для таких елементів може бути

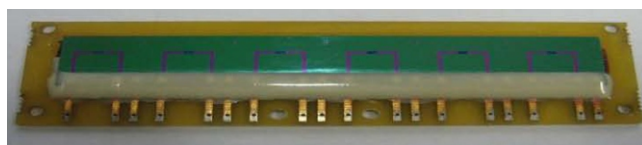


Рис. 3. Фото шестиканальної сенсорної лінійки на основі кремнієвих рН-ПТ

використане рознесення активної області затвора і металевих контактних площин на різні частини кристалу, що забезпечує, з одного боку, зручність доступу до активних ділянок транзисторів, а з другого – надійність ізоляції електричних контактів від розчину. Використання протяжних дифузійних шин від витоку і стоку, ізованих від розчину шаром діелектрика, є оптимальним вирішенням цієї задачі. На рис. 1 представлено схематичну конструкцію типової багатоканальної сенсорної лінійки, де наведено зазначені вище топологічні особливості рН-ПТ елементів, з яких створюється сенсорний масив. Кремнієві лінійки інтегральних рН-ПТ сенсорів виготовлено на НВО «Квазар» (Україна).

На рис. 2 продемонстровано топологію типового рН-ПТ перетворювача. Затвор з рН-чутливим поверхневим шаром нітриду кремнію виконаний у вигляді растрової «змійки» для збільшення відношення довжини каналу до його ширини, яке зазвичай дорівнює 1:200, що забезпечує високий коефіцієнт підсилення транзисторів. Порогова напруга транзисторів, як правило, становить приблизно  $-2,5$  В.

Однією з основних проблем ПТ є надійна герметизація контактів, підкладки та ліній різку транзисторних чипів від розчину електроліту, оскільки саме цими факторами визначається тривалість роботи всього приладу. Лінії витоку і стоку рознесено на 7 мм та довгими дифузійними шинами виведено на край пластини, де здійснюється розпайка виводів з наступною їхнього герметизацією за допомогою компаунда. Також завдяки вибраним габаритам ділянка затвора досить віддалена від лінії різку (краю пластини), тому рідкий проток ніяк не може впливати на роботу елемента. Відмітною рисою даної структури є покриття діелектричним шаром нітриду кремнію усїєї поверхні пластини. Крім

функції рН-чутливого затвора для ПТ-елементів, він відіграє також роль надійного хімічно стійкого ізоляційного шару для всього кристалу.

На рис. 3 наведено реальний вигляд багатоканальної сенсорної лінійки на шість каналів, змонтованої на спеціальній універсальній платі, де всі електричні контакти надійно ізольовано.

Сигнали відгуку рН-ПТ сенсорів вимірювали за допомогою схеми підтримання постійного струму витoku кожного транзистора, при цьому вихідний сигнал автоматично відслідковує будь-які зміни потенціалу поблизу затвора транзистора. Вимірювання здійснювали в таких режимах: струм каналу  $I_c = 20\text{--}30$  мкА, напруга стік-виток  $U_{cs} = 1$  В, напруга основи  $U_n = 0$ , вихідний сигнал транзисторів у межах  $2,7\text{--}3,0$  В.

Багатоканальність приладу дозволяє проводити вимірювання в диференційному режимі, коли один із транзисторів є референтним, а на затвори інших нанесено чутливі ферментні шари. Цей режим дозволяє значно послабити вплив таких факторів, як коливання температури та іонної сили розчину, вплив світла і електромагнітних перешкод на результати вимірювань, а також помітно знизити шуми приладу.

*Методика вимірювання.* Виміри здійснювали у 2 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, за кімнатної температури з використанням проточної системи вимірювання. Концентрацію субстратів змінювали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстратів. Ферменти інгібували експозицією мультибіосенсорного чипа протягом 20 хв у розчинах різних токсинів і їхніх сумішей за різних концентрацій – від 1 до 1000 мкМ.

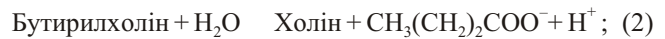
Дослідження виконували щонайменше з триразовим повторенням. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричним наведенням, пригнічували завдяки використанню диференційного режиму вимірювань.

**Результати і обговорення.** В основі роботи мультибіосенсора для інгібіторного аналізу токсинів лежить ефект пригнічення таких ферментативних реакцій та каскадів ферментативних реакцій:

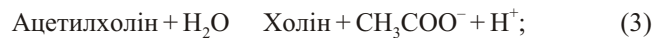
Уреаза



БуХЕ



АцХЕ



ГОД



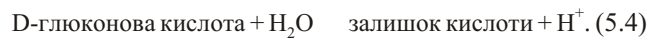
Інвертаза



Мутаротаза



ГОД



При проходженні реакцій (1–3) та каскадів реакцій (4, 5) змінюється концентрація протонів (відповідно має місце локальна зміна рН розчину в мембрані). Це дозволяє використовувати матрицю рН-чутливих польових транзисторів як перетворювача [15].

На рис. 4 наведено типовий вигляд експериментальних сигналів при проведенні інгібіторного аналізу на прикладі визначення іонів  $\text{Hg}^{2+}$ . За допомогою мультибіосенсора отримували початкові сигнали ( $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5$ ) на внесення в середовище суміші відповідних субстратів (10 мМ АцХ, 5 мМ БуХ, 5 мМ сечовина, 5 мМ цукроза та 2 мМ глюкоза). Величину кожного із сигналів приймали за 100 %. Потім мультибіосенсор розміщували у розчині з відповідним токсином на 20 хв (у даному разі  $\text{Hg}^{2+}$  з концентрацією 25 мкМ). Після інкубації мультибіосенсор відмивали від залишків токсину та знову отримували відгуки ( $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5$ ) на внесення до комірки тієї ж суміші відповідних субстратів. Залежно від величин сигналів одержували залишкові активності  $Z_n$  за формулою  $Z_n = Y_n \cdot 100/X_n$ , де  $X_n, Y_n$  – величини сигналів мультибіосенсора до і після інкубації його в розчині з іонами ртуті відповідно.

Для досягнення найкращої чутливості розробленого мультибіосенсора до токсинів необхідно



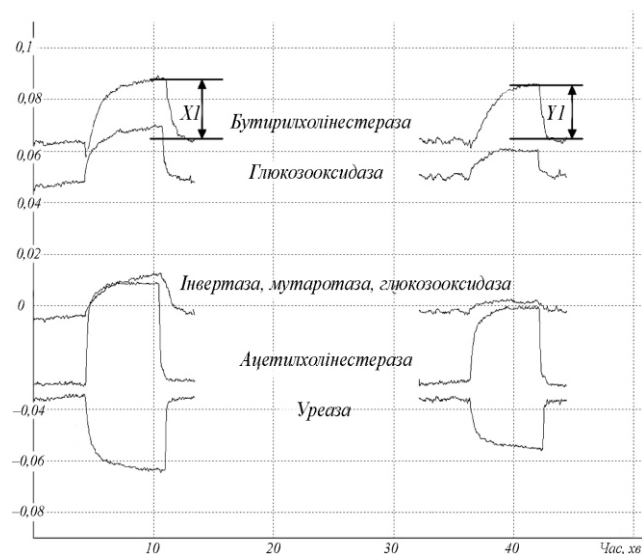


Рис. 4. Схема інгібиторного визначення токсинів за допомогою мультибіосенсора

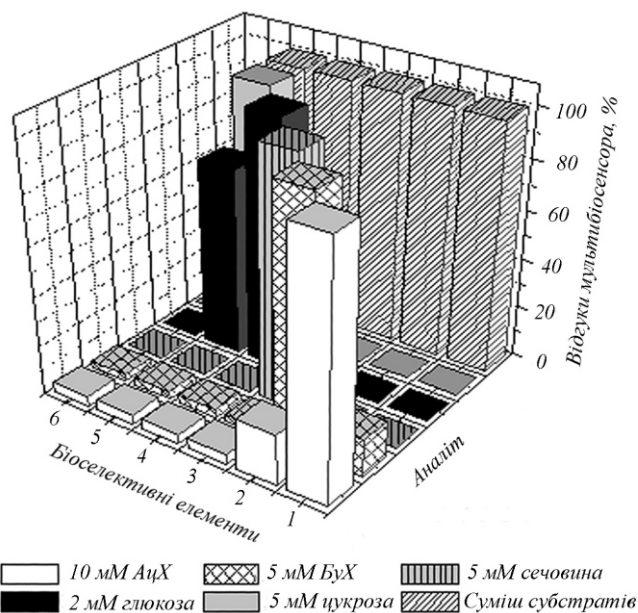


Рис. 6. Вплив окремих субстратів та їхньої суміші на відгуки біоселективних елементів мультибіосенсора: АцХЕ (1), БуХЕ (2), уреаза (3), ГОД (4), триферментна система (5) та БСА (6)

було визначити оптимальні концентрації субстратів для їхнього подальшого використання в інгібиторному аналізі. Теоретично оптимальна концентрація субстрату повинна перебувати в області насичення ферменту субстратом, коли кожна з молекул ферментів максимально залучена до процесів перетворення субстрату у кінцевий продукт, який

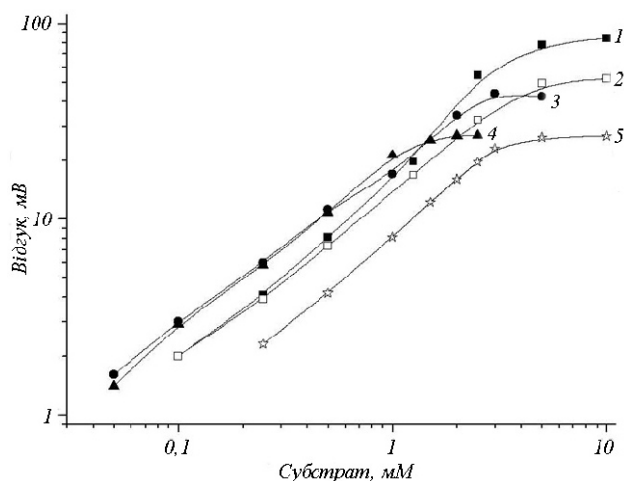


Рис. 5. Залежність величини відгуків мультибіосенсора з іммобілізованими на чутливі поверхні лінійки перетворювачів ферментами АцХЕ (1), уреазою (2), БуХЕ (3), ГОД (4) та триферментною системою (5) від концентрації відповідних субстратів

призводить до зміни рН і генерує максимальний відгук. У зв'язку з цим вивчали залежність величин відгуків мультибіосенсора від концентрацій відповідних субстратів (рис. 5). З цього рисунка видно, що при збільшенні концентрації субстратів спостерігаються класичні залежності величини відгуку від концентрації субстрату і для подальших експериментів в інгібиторному аналізі вирішено було використати концентрації субстратів, за яких відгуки мультибіосенсора є максимальними (в умовах максимального насичення ферментів субстратами). Таким чином, у подальших дослідках концентрації субстратів були такими: для АцХ – 10 мМ; БуХ – 5 мМ; сечовина – 5 мМ; цукроза – 5 мМ; глюкоза – 2 мМ.

Як відомо, матриця з біоселективними елементами мультибіосенсора повинна працювати одночасно в одному й тому ж середовищі та за однакових умов. Тому необхідно було перевірити наявність перехресного впливу субстратів для окремих біоселективних елементів. На рис. 6 представлено дані з відгуків матриці п'яти біоселективних елементів мультибіосенсора на кожний субстрат окремо та на їхню суміш. Видно, що з усіх використаних ферментів лише уреаза та ГОД, а відповідно й сенсорні елементи на їхній основі виявилися високоселективними до своїх субстратів – сечовини і глюкози.

*Інгібіторний вплив токсичних речовин та їхніх сумішей на біоселективні елементи мультибіосенсора (100 % – повне інгібування)*

Інгібітор	Уреаза, %	БуХЕ, %	АХЕ, %	ГОД, %	Триферментна система, %
1	2	3	4	5	6
1 мкМ трихлорфон	0	15	0	0	0
10 мкМ трихлорфон	0	50	5	0	0
50 мкМ трихлорфон	0	70	25	0	0
1 мМ трихлорфон	0	100	85	0	0
10 мМ трихлорфон	0	100	100	0	-14
1 мкМ карбофуран	0	25	5	0	0
10 мкМ карбофуран	0	70	25	0	0
100 мкМ карбофуран	0	100	50	0	0
2 мМ карбофуран	0	100	100	0	10
1 мкМ Ag <sup>+</sup>	0	0	5	15	11
10 мкМ Ag <sup>+</sup>	0	3	25	60	65
50 мкМ Ag <sup>+</sup>	10	7	70	100	99
0,2 мкМ Hg <sup>2+</sup>	0	0	0	0	5
1 мкМ Hg <sup>2+</sup>	4	0	0	10	22
10 мкМ Hg <sup>2+</sup>	25	3	10	50	70
50 мкМ Hg <sup>2+</sup>	65	7	70	90	100
10 мкМ Cu <sup>2+</sup>	10	0	0	0	0
50 мкМ Cu <sup>2+</sup>	30	0	0	0	5
200 мкМ Cu <sup>2+</sup>	70	0	15	10	30
10 мкМ Cd <sup>2+</sup>	12	0	0	0	5
50 мкМ Cd <sup>2+</sup>	65	0	15	10	30
200 мкМ Cd <sup>2+</sup>	100	0	40	40	70
Суміш 1	12	85	80	90	100
Суміш 2	20	100	80	70	75
Суміш 3	0	100	60	40	50
Суміш 4	50	60	30	45	80
Суміш 5	40	80	40	30	55
Суміш 6	0	100	40	5	15
Суміш 7	40	60	7	15	30
Суміш 8	45	5	35	70	70
Суміш 9	30	100	100	100	100

*Закінчення таблиці*

1	2	3	4	5	6
Суміш 10	0	75	40	30	25
Суміш 11	0	100	40	15	10
Суміш 12	0	60	20	5	5
Суміш 13	0	60	10	0	0
Суміш 14	5	75	20	35	45
Суміш 15	5	50	15	35	50

П р и м і т к а. Суміш 1: 6 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 8 мкМ Ag<sup>+</sup> + 53 мкМ трихлорофон; Суміш 2: 9 мкМ Cd<sup>2+</sup> + 12 мкМ Ag<sup>+</sup> + 50 мкМ карбофуран; Суміш 3: 5 мкМ Ag<sup>+</sup> + 85 мкМ карбофуран + 13 мкМ трихлорофон; Суміш 4: 23 мкМ Cd<sup>2+</sup> + 5 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 10 мкМ трихлорофон; Суміш 5: 25 мкМ Cu<sup>2+</sup> + 5 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 150 мкМ трихлорофон; Суміш 6: 0,5 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 10 мкМ карбофуран + 10 мкМ трихлорофон; Суміш 7: 50 мкМ Cu<sup>2+</sup> + 1 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 5 мкМ трихлорофон; Суміш 8: 15 мкМ Cd<sup>2+</sup> + 15 мкМ Cu<sup>2+</sup> + 15 мкМ Ag<sup>+</sup>; Суміш 9: 25 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 25 мкМ Ag<sup>+</sup> + 50 мкМ трихлорофон + 50 мкМ карбофуран; Суміш 10: 2 мкМ Cd<sup>2+</sup> + 2,5 мкМ Ag<sup>+</sup> + 10 мкМ карбофуран; Суміш 11: 1 мкМ Ag<sup>+</sup> + 17 мкМ карбофуран + 2,5 мкМ трихлорофон; Суміш 12: 0,25 мкМ Ag<sup>+</sup> + 4 мкМ карбофуран + 0,75 мкМ трихлорофон; Суміш 13: 0,1 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 2 мкМ карбофуран + 2 мкМ трихлорофон; Суміш 14: 1,25 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 1,25 мкМ Ag<sup>+</sup> + 2,5 мкМ трихлорофон + 2,5 мкМ карбофуран; Суміш 15: 1,25 мкМ Hg<sup>2+</sup> + 1,6 мкМ Ag<sup>+</sup> + 10 мкМ трихлорофон.

Біоматриці на основі ферментів АцХЕ та БуХЕ характеризувалися невеликою перехресною чутливістю до субстратів ацетилхоліну та бутирилхоліну. У той же час вони були нечутливими до субстратів інших ферментів. Біоселективний елемент на основі трьох ферментів (інвертаза, мутаротаза та ГОД) для визначення цукрози був нечутливим до всіх перехресних субстратів, окрім глюкози, і цей вплив виявився значним, що зрозуміло, оскільки в складі зазначеного біоселективного елементу присутній фермент ГОД. При внесенні повної суміші субстратів всі біоселективні елементи мультибіосенсора демонстрували такі ж величини відгуків, як і при внесенні кожного субстрату окремо. Ще одним показником якісної роботи мультибіосенсора було те, що всі субстрати та їхня суміш майже не впливали (реакція в межах похибки) на сенсорний елемент, на який було нанесено референтну мембрану з БСА.

Наведені вище результати перехресного впливу специфічних субстратів на відгуки сенсорних елементів мультибіосенсора є дуже важливими при використанні мультибіосенсора в інгібіторному аналізі і в подальшому їх буде враховано при визначенні токсинів у реальних зразках довкілля.

Важливе значення при визначенні концентрацій токсинів відіграє час інкубації мульт-

тибіосенсорів у досліджуваних розчинах. Як відомо, за необхідності визначення дуже малих концентрацій токсину потрібно збільшувати час інгібування, а відповідно і загальний час проведення аналізу. Тому треба обирати компромісні умови, за яких при відносно невеликому часі інгібування і відповідно часі проведення усього аналізу є можливість визначати досить низькі концентрації токсинів. Отже, наступним етапом нашої роботи було встановити єдиний оптимальний час інкубації мультибіосенсора для всіх ферментативних систем. Результати аналізу рівня інгібування біоселективних елементів залежно від часу інгібування представлено на рис. 7. На рис. 7, а, наведено графіки для ферментів уреазы, ГОД та триферментної системи інвертаза–мутаротаза–глюкозооксидаза. Всі вони в більшій мірі інгібуються важкими металами, ніж пестицидами, тому як інгібітор для них використали 25 мкМ Hg<sup>2+</sup>. А такі ферменти, як АцХЕ і БуХЕ, більш виражено інгібуються пестицидами і відповідно для їхнього інгібування використано 50 мкМ трихлорофон (рис. 7, б). Як видно з графіків, найінтенсивніше процес інгібування протікає в перші 20 хв, надалі швидкість інгібування у ГОД та триферментної системи дещо зменшується. Тому для подальшої роботи ми вибрали час інкубації у розчині токсинів, рівний 20 хв: при

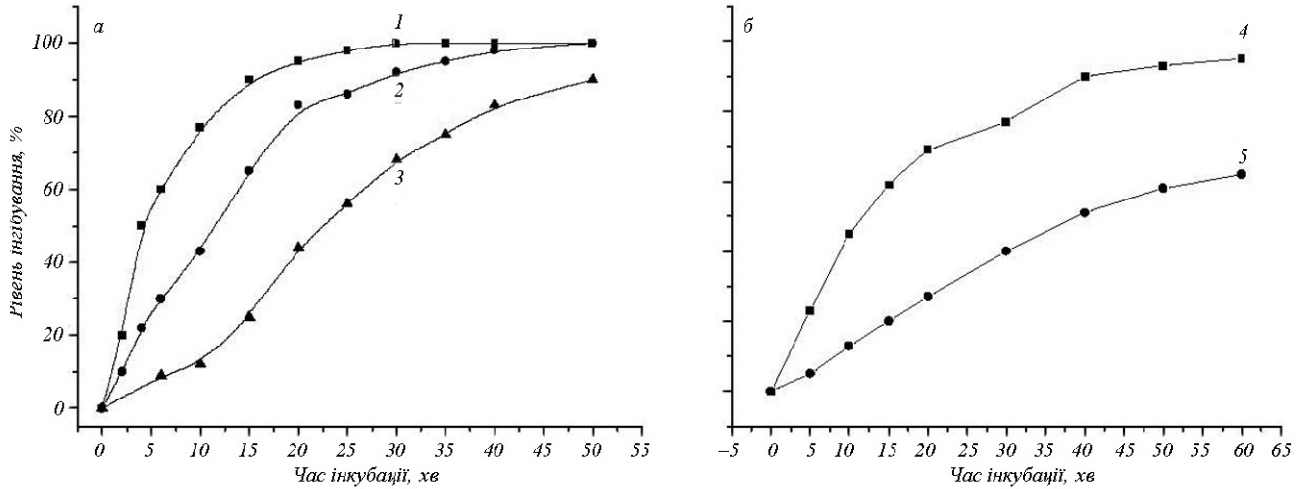


Рис. 7. Залежність рівня інгібування ферментативних систем від часу інкубації мультибіосенсора в 25 мкМ  $\text{Hg}^{2+}$  (а) та 50 мкМ трихлорофені (б) (1 – триферментна система; 2 – ГОД; 3 – уреаза; 4 – АцХЕ; 5 – БуХЕ). Вимірювання проводили у 2 мМ фосфатно-му буфері, рН 6,5, концентрація субстратів – 10 мМ АцХ, 5 мМ БуХ, 5 мМ сечовина, 5 мМ цукроза та 2 мМ глюкоза

цьому спостерігається достатньо високий рівень пригнічення усіх біоселективних елементів, досить інтенсивно відбувається взаємодія фермент–токсин і загальний час проведення аналізу невеликий.

Ще одним етапом роботи стало вивчення інгібіторного впливу окремих токсинів та їхніх сумішей на ферментативні системи у складі мультибіосенсора. Отримані в експерименті величини інгібування ферментативних систем різними концентраціями токсинів та різноманітними варіантами сумішей наведено в таблиці.

Експериментальні дані, наведені в таблиці, надалі буде використано для їхнього аналізу методами математичної статистики для відпрацювання підходів кількісного або напівкількісного визначення токсинів при роботі з реальними зразками довокілья.

**Висновки.** У роботі досліджено та оптимізовано мультибіосенсор на основі матриці рН-чутливих польових транзисторів з іммобілізованими ферментами ацетил- та бутирилхолінестерази, уреази, глюкозооксидази та триферментної системи інвертаза–мутаротаза–глюкозооксидаза для визначення токсичних речовин.

Підбрано оптимальні умови роботи ферментів та проаналізовано основні аналітичні характеристики мультисенсора при його використанні в інгібіторному аналізі токсичних речовин у зразках

водних розчинів. Розроблений мультибіосенсор у подальшому буде використаний для інгібіторного ферментного аналізу токсичних речовин у водних зразках.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб».

*O. O. Soldatkin, O. S. Pavluchenko, O. L. Kukla, V. M. Arkhylova, S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin, A. V. El'skaya*

Optimization of multibiosensor operation for inhibitory analysis of toxins

Summary

*The operation of highly sensitive and selective multibiosensor based on different immobilized enzymes as bioselective elements and the matrix of pH-sensitive field effect transistors as transducers has been investigated. To develop bioselective elements of multibiosensor, the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, urease, glucose oxidase, and three-enzyme system invertase-mutarotase-glucose oxidase with high sensitivity to toxins were used. The optimal concentrations of substrates for inhibitory analysis application were chosen as follows: 10 mM acetylcholine, 5 mM butyrylcholine, 5 mM urea, 5 mM sucrose, and 2 mM glucose. The incubation time of multibiosensor in toxic solution was 20 min. No cross-influence of substrates in all the enzyme systems used was found. The inhibitory influence of separate toxins and their mixture on the bioselective elements of multibiosensor was studied.*

*Keywords: multibiosensor, immobilized enzymes, pH-sensitive field-effect transistors, glucose, inhibitory analysis, toxins.*



А. А. Солдаткин, А. С. Павлюченко, А. Л. Кукла, В. Н. Архипова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская

Оптимизация работы мультибиосенсора при ингибиторном анализе токсинов

#### Резюме

Исследована работа высокочувствительного и селективного мультибиосенсора на основе ряда иммобилизованных ферментов как биоселективных элементов и матрицы рН-чувствительных полевых транзисторов как преобразователей биохимического сигнала в электрический. Для создания биоселективных элементов мультибиосенсора использовали ферменты ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразу, уреазу, глюкозооксидазу и трехферментную систему инвертаза-мутаротаза-глюкозооксидаза, демонстрирующие высокую чувствительность к действию токсинов. Определены оптимальные концентрации субстратов для использования в ингибиторном анализе, которые составили для ацетилхолина 10 мМ, бутирилхолина – 5 мМ, мочевины – 5 мМ, сахарозы – 5 мМ и глюкозы – 2 мМ. Время инкубации мульти- биосенсора в токсичных растворах составило 20 мин. Показано, что перекрестное влияние субстратов для всех использованных ферментных систем практически отсутствует. Также проверено действие отдельных токсинов и их смесей на биоселективные элементы мультибиосенсора.

Ключевые слова: мультибиосенсор, иммобилизованные ферменты, рН-чувствительные полевые транзисторы, ингибиторный анализ, токсины.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Солдаткин О. О., Сосовська О. Ф., Бенілова І. В., Гончар М. В., Корпан Я. І. Энзимний кондуктометричний сенсор для визначення формальдегіду у модельних розчинах // Біополімери і клітина.–2005.–**21**, № 5.–С. 425–432.
2. Сосовська О. Ф., Павлішко Г. М., Парижак С. Я., Гончар М. В., Корпан Я. І. Формальдегідний кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінованої формальдегіддегідрогенази дріжджів *Hansenula polymorpha* // Біополімери і клітина.–2008.–**24**, № 2.–С. 135–141.
3. Dzyadevych S. V., Mai Anh T., Soldatkin A. P., Duc Chien N., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M. Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds // Bioelectrochemistry.–2002.–**55**.–P. 79–81.
4. Korpan Y. I., Gonchar M. V., Sibirny A. A., Martelet C., El'skaya A. V., Gibson T. D., Soldatkin A. P. Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination // Biosensors and Bioelectronics.–2000.–**15**.–P. 77–83.

5. Berezhetzskyy A. L., Durrieu C., Nguyen-Ngoc H., Chovelon J.-M., Dzyadevych S. V., Tran-Minh C. Conductometric biosensor based on whole-cell microalgae for assessment of heavy metals in wastewater // Біополімери і клітина.–2007.–**23**, № 6.–С. 511–518.
6. Soldatkin A. P., Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., El'skaya A. V., Gravouelle J.-M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs // Talanta.–2005.–**66**.–P. 28–33.
7. Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Arkhypova V. N., El'skaya A. V., Chovelon J.-M., Georgiou C. A., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for environmental monitoring based on enzyme inhibition // Sensors and Actuators B.–2005.–**105**.–P. 81–87.
8. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // Biosensors and Bioelectronics.–2003.–**18**.–P. 1047–1053.
9. Солдаткин О. О., Пшикова В. М., Дзядевич С. В., Солдаткин О. П., Сльська Г. В. Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для селективного визначення іонів важких металів // Sensor Electronics and Microsystem Technologies.–2008.–**2**.–С. 48–57.
10. Arkhipova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Jaffresic H., Martlet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances // Talanta.–2001.–**55**.–P. 919–927.
11. Kukla A. L., Kanjuk N. I., Starodub N. F., Shirshov Yu. M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions // Sensors and Actuators B.–1999.–**57**.–P. 213–218.
12. Moreno L., Merlos A., Abramova N., Jimenez C., Bratov A. Multi-sensor array used as an «electronic tongue» for mineral water analysis // Sensors and Actuators B.–2006.–**116**.–P. 130–134.
13. Touloupakisa E., Giannoudi L., Piletsky S. A., Guzzella L., Pozzoni F., Giardi M. T. A multi-biosensor based on immobilized Photosystem II on screen-printed electrodes for the detection of herbicides in river water // Biosensors and Bioelectronics.–2005.–**20**.–P. 1984–1992.
14. Солдаткин О. О., Назаренко О. А., Павлюченко О. С., Кукла О. Л., Архипова В. М., Дзядевич С. В., Солдаткин О. П., Сльська Г. В. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора // Біополімери і клітина.–2008.–**24**, № 1.–С. 42–50.
15. Дзядевич С. В. Биосенсоры на основе ионселективных полевых транзисторов: теория, технология, практика // Біополімери і клітина.–2004.–**20**, № 1–2.–С. 7–16.

УДК 577.151.4:544.475:543.554.2

Надійшла до редакції 13.05.08