

Оптимізація біоселективної мембрани амперометричного ензимосенсора на основі глюкозооксидази із застосуванням багат шарових карбонових нанотрубок, модифікованих аміногрупами

О. А. Білоіван, Н. С. Рогальова, Я. І. Корпан

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

o.a.biloivan@imbg.org.ua

Мета. Дослідити можливість застосування багат шарових карбонових нанотрубок, модифікованих аміногрупами (БНТ-NH₂), для створення чутливих елементів амперометричного біосенсора на основі іммобілізованих оксидоредуктаз, зокрема глюкозооксидази (ГОД), та вивчити електрохімічні властивості отриманих мембран. **Методи.** Експерименти проведено з використанням амперометричних методів за допомогою приладу Stat 200 («DropSens», Іспанія). Ферменти іммобілізували у випарах глутарового альдегіду. **Результати.** Оптимізовано метод формування біоселективної матриці біосенсора на основі іммобілізованої ГОД з БНТ-NH₂ на поверхні золотих амперометричних електродів. Визначено оптимальні умови роботи біосенсора на її основі. **Висновки.** Показано, що включення БНТ до біоселективної матриці біосенсора покращує його аналітичні характеристики: сприяє підвищенню величини сигналу та розширенню лінійного діапазону для встановлення рівня глюкози, дає можливість визначати субстрат у широких межах значень робочого потенціалу).

Ключові слова: багат шарові вуглецеві нанотрубки, модифіковані аміногрупами, амперометричний біосенсор, оксидоредуктази, глюкозооксидаза.

Вступ. Останнім часом велика увага світової наукової спільноти приділяється розвитку нанотехнологій, за використання яких можливий технологічний прорив у багатьох галузях науки і виробництва, зокрема, в медицині та фармакології. Застосування нових карбонових матеріалів, таких як фулерени та нанотрубки, незважаючи на те, що їхні електрохімічні властивості ще не повністю охарактеризовані та досліджені, вже відкрило новий напрямок при створенні біо- та хемосенсорів [1–3]. Можливість іммобілізації ферментів на поверхню

нанотрубок, використання їх як електронних медіаторів та конструювання наноструктурних сенсорів – це лише деякі приклади ефективного використання таких матеріалів у біосенсоріці. Впродовж останніх 10 років опубліковано чимало робіт з розробки електрохімічних біосенсорів із включенням до складу біоселективних мембран як одно-, так і багат шарових нанотрубок для покращення аналітичних характеристик сенсорів [1–3]. У таких роботах, як правило, модифікують поверхню нанотрубок різними групами для зв'язування білка і найуживанішою з-поміж них є модифікація карбоксильними групами [1–5]. У даній

роботі досліджено можливість застосування багат шарових карбонових нанотрубок, модифікованих аміногрупами, для створення чутливих елементів амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої оксидоредуктази (глюкозооксидази) та вивчено електрохімічні властивості отриманих мембран.

Матеріали і методи. *Матеріали.* Використовували глюкозооксидазу (ГОД) (ЕС 1.1.3.4) з *Aspergillus niger* активністю 271 од/мг фірми «Gengyete Corp.» (Німеччина), D-глюкозу, бичачий сироватковий альбумін (БСА) та 50 %-й розчин глютарового альдегіду (ГА) виробництва «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина), багат шарові нанотрубки, модифіковані NH_2 -групами (БНТ- NH_2), фірми «DropSens» (Іспанія), полівінілпіролідон (ПВП) виробництва фірми «Merck» (Німеччина), диметилсульфоксид (ДМС), диметилформамід (ДМФА) та інші сполуки вітчизняного виробництва категорії «х. ч.» і «ч. д. а.».

Конструкція біосенсора. У роботі використано триелектродні перетворювачі C220AT (далі по тексті – «золоті електроди»), виготовлені методом трафаретного друку, виробництва фірми «Drop Sens» (рис. 1, а, див. уклеюку) та біпотенціостат Stat 200, сумісний з персональним комп'ютером, виробництва тієї ж фірми.

Усі електрохімічні вимірювання проводили згідно з інструкціями, наданими фірмою-виробником (деталі можна знайти на веб-сайті http://www.drop_sens.com/en/inicio.html). Для створення лабораторних макетів біосенсорів чутливу мембрану формували на поверхні робочого електрода іммобілізацією глюкозооксидази.

При контрольних вимірюваннях застосовували датчики як без мембрани, так і з відповідними мембранами без ферменту.

Формування біоматриці сенсора. Перед проведенням іммобілізації поверхню робочого електрода обробляли хромовою сумішшю, ретельно відмивали дистильованою водою та висушували етанолом. Наважку БНТ- NH_2 масою 2 мг суспендували в 1 мл ДМС, ДМФА або водному розчині ПВП (100 мг/мл) із застосуванням ультразвукового сонікатора RK 102 H («Bandelin electronic», Німеччина) протягом 30 хв за кімнатної температури.

Чутливу матрицю біосенсора формували нанесенням крапельним методом на поверхню робочого електрода 1,7 мкл відповідної вихідної суміші та подальшою іммобілізацією ковалентним зшиванням у білковий гель в насичених парах ГА [6]. Мембранна суміш містила 0,05 % ГОД, 6 % БСА, 2 % суспензії БНТ- NH_2 та 5 % гліцерину (далі – «суміш ГОД-БСА-БНТ»). Розчини білків готували із застосуванням 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,0. Електроди з нанесеною сумішшю інкубували в парах ГА протягом 40 хв за кімнатної температури. Після цього мембрани висушували на повітрі впродовж 30 хв та тричі відмивали 25 мМ фосфатним буфером (рН 7,0). Контрольну мембранну суміш готували за тією ж процедурою, але без додавання нанотрубок (далі – «суміш ГОД-БСА»).

Електрохімічні вимірювання. Вивчення вольтамперних характеристик електродів і вимірювання амперометричного сигналу біосенсорів здійснювали за допомогою приладу Stat 200 («DropSens») із відповідним програмним забезпеченням, підключеного до комп'ютера. Експериментальна установка містила також скляну комірку для розчину, електромагнітну мішалку, штатив і гнучкий перехідник, який з'єднує електричні контакти сенсора з приладом (рис. 1, б, див. уклеюку).

Вимірювання проводили у відкритій комірці об'ємом 2,5 мл у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за кімнатної температури та при інтенсивному перемішуванні. Перед початком експериментів електродну ділянку біосенсора витримували у робочому буфері протягом 40 хв. Концентрацію субстратів у комірці змінювали, додаючи певні аліквоти вихідних розчинів. За величину сигналу біосенсора, що відповідає певній концентрації субстрату, вважали середнє арифметичне з трьох вимірювань. Похибка вимірювань не перевищувала 5 %. Вольтамперні характеристики електродів визначали методом циклічної вольтамперметрії у 25 мМ фосфатному буфері та з додаванням 0,86 мМ H_2O_2 або 20 мМ глюкози. Вимірювання здійснювали при швидкості 100 мВ/с з чотирма повторами.

Результати і обговорення. Глюкозооксидаза – це найвивченіша, стабільна і комерційно доступна оксидоредуктаза, яку широко застосовують як модельний фермент при створенні нових техноло-

гічних підходів для розробки сенсорів. Амперометричний сенсор на основі іммобілізованої ГОД дозволяє визначати глюкозу за принципом реєстрації пероксиду водню, який утворюється внаслідок реакції



Пероксид водню розкладається на робочому електроді з утворенням 2H^+ , 2e^- та O_2 . Вивільнення електронів призводить до зміни сили струму на межі розподілу «електрод–розчин» пропорційно до концентрації глюкози.

Перед початком досліджень вивчали вольтамперні характеристики золотих електродів DropSens без ферментних мембран. Знайдено, що швидкість 100 мВ/с є оптимальною для проведення вимірювань методом циклічної вольтамперметрії (рис. 2, див. уклейку).

На рис. 3 (див. уклейку) представлено типові вольтамперні криві для золотих електродів Drop Sens без ферментних мембран у 25 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) (рис. 3, а, б, криві 1, див. уклейку) та після додавання пероксиду водню (рис. 3, а, крива 2, див. уклейку) і глюкози (рис. 3, б, крива 2, див. уклейку). Показано, що додавання пероксиду водню «зсуває» величину сигналу електрода при потенціалі 0,1–0,9 В. Це свідчить про перетворення H_2O_2 на поверхні електрода, у той час як додавання глюкози практично не змінює форми кривої. Потенціал 0,8 В обрано нами за оптимальний для проведення подальших амперометричних вимірювань. Встановлено, що глюкоза не окиснюється/відновлюється на електроді при такому значенні потенціалу (рис. 3, б, крива 2, див. уклейку).

Розробка методу формування біоселективної мембрани на основі БНТ- NH_2 і ГОД включає три етапи:

- вибір способу суспендування нанотрубок;
- вибір методу іммобілізації нанотрубок і ГОД на поверхню електрода;
- вивчення електрохімічних властивостей розробленої мембрани.

Нанотрубки суспендували за допомогою ультразвуку в розчинниках ДМС, ДМФА і ПВП (як описано в розділі «Матеріали і методи»). У разі за-

стосування ДМС зміни стану нанотрубок не спостерігали. При використанні ДМФА відмічено часткове збільшення об'єму БНТ. Найліпші результати отримано за використання ПВП. У цьому випадку отримано стабільну суспензію нанотрубок. Крім того, ПВП, який слугує заміном крові і входить до складу ліків та косметичних засобів, є менш токсичним для ферменту [7].

Для створення мембран на основі іммобілізованої ГОД із застосуванням БНТ- NH_2 нами обрано метод зшивання за допомогою ГА. Раніше показано можливість розробки глюкозних біосенсорів на основі вуглецевих волокон за рахунок іммобілізації глюкозооксидази в білковий гель (БСА) у парах ГА [8, 9]. ГА, який є біфункціональним агентом, створює міжмолекулярні зшивки між NH_2 -групами речовин з утворенням шиффових основ. Реакція проходить за м'яких умов, що дозволяє зберегти фермент у нативному стані [10]. Окрім того, зв'язування БНТ- NH_2 з молекулами ферменту повинно полегшувати перенесення електронів між активним центром ферменту та поверхнею робочого електрода [1, 2].

Нашими попередніми експериментами з іммобілізації суміші ГОД із суспензією БНТ без БСА виявлено, що такі мембрани мали низьку ферментативну активність, а нанотрубки швидко вимивалися. Тому в подальших дослідах для іммобілізації ми використали мембранну суміш з додаванням БСА (див. «Матеріали і методи»).

На рис. 4 представлено залежності величини амперометричного сигналу від концентрації глюкози для біосенсора, створеного на основі золотих електродів фірми «DropSens» і мембрани ГОД–БСА–БНТ, у порівнянні з контрольними датчиками. Встановлено наявність ферментативної активності у сенсорів, які містять ГОД (рис. 4, криві 1, 2), на відміну від датчика з мембраною на основі іммобілізованого БСА та «голого» електрода (відповідно рис. 4, криві 3, 4). Як можна бачити, шар іммобілізованого БСА не впливає суттєво на величину сигналу біосенсора. Додавання нанотрубок до мембрани призводить до підсилення сигналу біосенсора у 1,5 разу та розширення лінійного діапазону визначення глюкози (з 0,1–4,0 до 0,1–5,0 мМ відповідно) (таблиця).

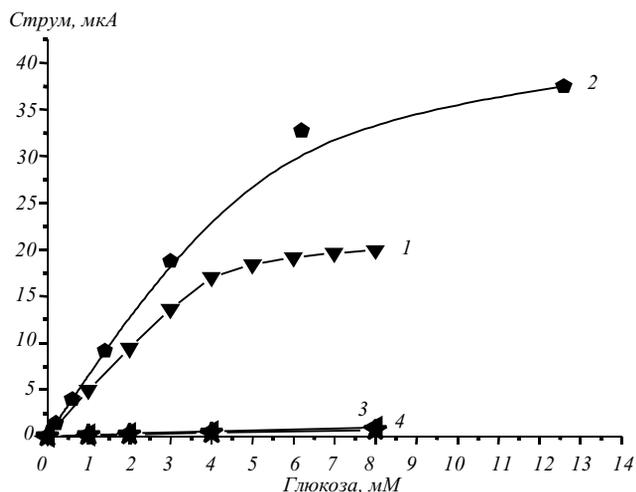


Рис. 4. Залежності величини амперометричного сигналу датчиків від концентрації глюкози у 25 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) при поданому потенціалі 0,8 В: 1 – для біосенсора на основі мембранної суміші ГОД–БСА та 2 – на основі мембранної суміші ГОД–БСА–БНТ; 3 – для контрольного датчика з мембраною з БСА без ферменту; 4 – для електрода без мембрани

Наступним етапом дослідження стало визначення оптимальних умов для вимірювання амперометричного сигналу біосенсора на основі золотих електродів і мембрани ГОД–БСА–БНТ. На рис. 5, а, наведено залежність величини сигналу сенсора від концентрації робочого буфера. Дослідження показали, що при концентрації фосфатного буфера,

вищій за 25 мМ, величина сигналу біосенсора суттєво не змінюється. Це є характерним для амперометричних датчиків на основі ГОД [8, 11].

Потенціал, В	ГОД–БСА		ГОД–БСА–БНТ	
	Чутливість, мкА/мМ	Лінійний діапазон, мМ	Чутливість, мкА/мМ	Лінійний діапазон, мМ
-0,5	–	–	6,0	0,1–1,0
-0,2	–	–	5,4	0,1–1,0
-0,2	0,1	–	2,6	0,1–1,3
0,5	3,4	0,1–2,0	4,3	0,1–2,0
0,8	4,8	0,1–3,0	6,6	0,1–5,0

Враховуючи вищевикладене, рН-оптимум створеного біосенсора знаходили у 25 мМ фосфатному буфері в діапазоні значень рН 6,0–8,0 (рис. 5, б). Як відомо, нативна ГОД за температури 25 °С не змінює своєї ферментативної активності в діапазоні рН 6,0–8,6 [12].

Виявлено зсув рН-оптимуму відносно нативної ГОД у лужну область з оптимумом при рН 7,0, що може бути спричинено зміною локального рН у мембрані та дифузійними процесами, викликаними накопиченням протонів, які

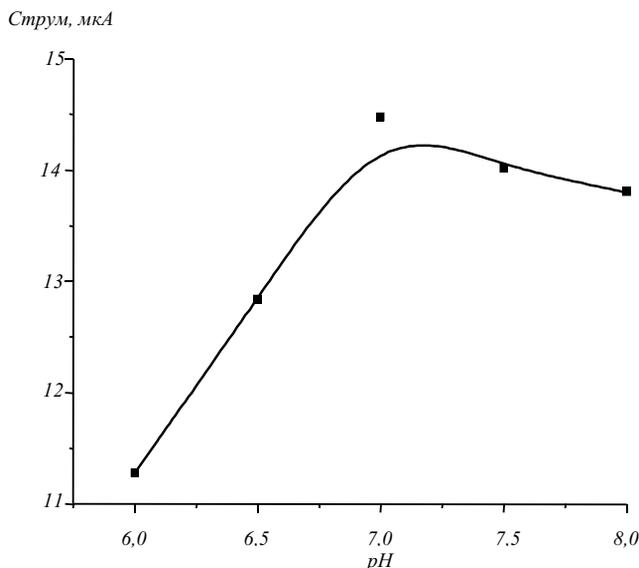
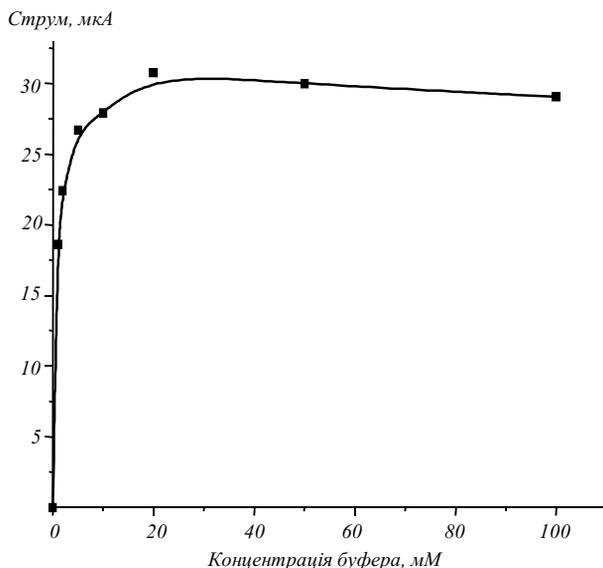


Рис. 5. Оптимізація умов вимірювання сигналу біосенсора на основі золотих амперометричних електродів та мембрани ГОД–БСА–БНТ: а – залежність величини відгуку біосенсора від концентрації фосфатного буфера (рН 7,0) та б – від величини рН 25 мМ фосфатного буфера. Відгуки вимірювали після додавання 2,5 мМ глюкози за температури 25 °С

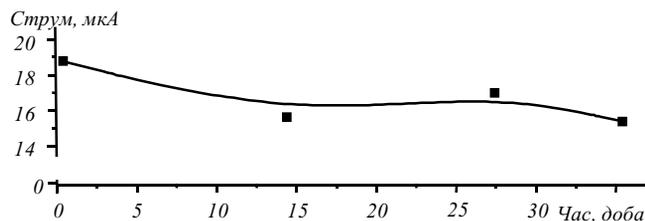


Рис. 7. Залежність величини відгуку біосенсора, створеного на основі ГОД–БСА–БНТ, при однаковій концентрації глюкози (3 мМ) від часу зберігання у сухому вигляді за температури 4 °С. Вимірювання проводили за постійного потенціалу (0,8 В)

утворюються внаслідок відновлення продукту ферментативної реакції H_2O_2 на електроді [13]. Звуження оптимального діапазону рН також можна пояснити обмеженням здатності іммобілізованого ферменту змінювати свою третинну структуру у відповідь на зміну рН.

Таким чином, проведеними дослідженнями показано, що створена нами мембрана біосенсора на основі іммобілізованої ГОД із залученням БНТ дає змогу зберігати основні властивості ферменту та є придатною до роботи за умов, оптимальних для нативного ферменту. Відтак вона може забезпечити поліпшення таких аналітичних характеристик біосенсора, як підвищення вимірюваного сигналу та розширення лінійного діапазону. У той же час основні очікування від застосування нанотрубок пов'язані з можливістю ефективної роботи біосенсора за різних значень робочих потенціалів. Це необхідно для проведення вимірювань, зокрема глюкози, у біологічних рідинах та харчових продуктах, щоб зменшити вплив інтерферуючих речовин, які можуть окиснюватися чи відновлюватися при значеннях потенціалу, близьких до 0,8 В. На рис. 6 (див. уклейку) представлено вольтамперні криві, отримані для сенсорів на основі іммобілізованих сумішей ГОД–БСА (а) та ГОД–БСА–БНТ (б) у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0 (криві а1 та б1, див. уклейку) та за присутності 20 мМ глюкози (криві а2 та б2, див. уклейку). Показано, що для біосенсора на основі ГОД–БСА–БНТ характерною є зміна сигналу у ширшому діапазоні потенціалу (рис. 6, б, див. уклейку). Це також підтверджено результатами вимірювань калібрувальних кривих біосенсорів для визначення глюкози при різних робочих потенціалах, наведених на рис. 6 (б, 2, див.

уклейку) та в таблиці. Незважаючи на те, що активність сенсора при потенціалах $-0,5$; $-0,2$; $0,2$ та $0,5$ В виявилася значно нижчою, ніж при потенціалі $0,8$ В, вона може бути достатньою для проведення вимірювань глюкози.

Дослідження стабільності при зберіганні розробленого біосенсора на основі мембрани ГОД–БСА–БНТ у сухому вигляді за температури 4 °С протягом 35 днів показало, що створена мембрана є досить стабільною і зберігає до 85 % своєї активності. Слід зазначити, що найбільші зміни величини відгуку розробленого біосенсора спостерігали у перші два тижні, надалі величина відгуку залишається майже постійною (похибка вимірювань становить близько 7 %) (рис. 7). Досліди з підвищення стабільності біосенсора тривають. Вирішення цієї проблеми можливе за оптимізації стабілізуювальних агентів та більш ретельного підбору умов зберігання.

Висновки. Оптимізовано метод формування біоселективної матриці біосенсора на основі іммобілізованої ГОД з БНТ, модифікованих аміногрупами, на поверхню золотих амперометричних електродів DropSens. Визначено оптимальні умови для роботи мембрани (25 мМ фосфатний буфер, рН 7,0) та показано, що вони близькі до оптимальних умов роботи нативного ферменту.

Встановлено, що включення БНТ до мембрани біосенсора сприяє підвищенню величини сигналу, розширює лінійний діапазон вимірюваних концентрацій глюкози та дає можливість визначати субстрат у широких межах робочого потенціалу.

O. A. Biloivan, N. S. Rogaleva, Ya. I. Korpan

Optimization of bioselective membrane of amperometric enzyme sensor on basis of glucose oxidase using NH_2 -modified multi-wall carbone nanotubes

Summary

Aim. To investigate a possibility of application of multi-wall carbone nanotubes modified with NH_2 -groups (MWCNT- NH_2) for creation of sensitive elements of the amperometric biosensor based on immobilized oxidoreductases, in particular, glucose oxidase (GOD). To study electrochemical properties of the membranes obtained. **Methods.** Experiments were carried out with amperometric methods using the mStat 200 device («DropSens», Spain). The enzymes were immobilised in glutaraldehyde vapour. **Results.** The method of formation of bioselective matrix based on immobilised GOD with MNP- NH_2 on the surface of gold amperometric electrodes was optimised. Optimal working conditions of

the biosensor developed were determined. **Conclusion.** MWCNT integration into a bioselective matrix improves the biosensor analytical characteristics which means: higher signal value, wider linear range of glucose analysis, and possibility of substrate determination in wide range of working potential.

Keywords: NH_2 -modified multi-wall carbon nanotubes, amperometric biosensor, oxidoreductase, glucose oxidase.

O. A. Белоуван, Н. С. Роголева, Я. И. Корпан

Оптимизация биоселективной мембраны амперометрического энзимосенсора на основе глюкозооксидазы с использованием мультитеночных карбоновых нанотрубок, модифицированных аминокеттонами

Резюме

Цель. Исследовать возможность использования мультитеночных карбоновых нанотрубок, модифицированных аминокеттонами (MHT-NH_2), для создания чувствительного элемента амперометрического биосенсора на основе иммобилизованных оксидоредуктаз, в частности глюкозооксидазы (ГОД), и изучить электрохимические свойства полученных мембран. **Методы.** Эксперименты проводили с использованием амперометрических методов с помощью прибора mStat 200 («Drop-Sens», Испания). Ферменты иммобилизовали в парах глутарового альдегида. **Результаты.** Оптимизирован метод формирования биоселективной матрицы биосенсора на основе иммобилизованной ГОД с MHT-NH_2 на поверхности золотых амперометрических электродов. Определены оптимальные условия функционирования биосенсора на ее основе. **Выводы.** Показано, что включение MHT в состав биоселективной матрицы биосенсора улучшает его аналитические характеристики: способствует увеличению величины сигнала и расширению линейного диапазона для нахождения уровня глюкозы, дает возможность определять субстрат в широких границах значений рабочего потенциала).

Ключевые слова: мультитеночные карбоновые нанотрубки, модифицированные аминокеттонами, амперометрический биосенсор, оксидоредуктазы, глюкозооксидаза.

PERELIK LITERATURY

1. Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M. Role of carbon nanotubes in electrochemical chemistry. A review // Anal. Chim. Acta.–2008.–**622**, N 1–2.–P. 11–47.

2. Sotiropoulou S., Gavalas V., Vamvakaki N. A., Chaniotakis N. A. Novel carbon materials in biosensor system // Biosensors and Bioelectronics.–2003.–**18**, N 2–3.–P. 211–215.
3. Sotiropoulou S., Chaniotakis N. A. Carbon nanotube array-based biosensor // Anal. Bioanal. Chem.–2003.–**375**, N 1.–P. 103–105.
4. Sheng Q., Zheng J. B. Enzyme system for the biocatalyzed deposition of polyaniline templated by multiwalled carbon nanotubes: A biosensor design // Biosensors and Bioelectronics.–2009.–**24**, N 6.–P. 1621–1628.
5. Guan W. J., Li Y., Chen Y.-Q., Zhang X.-B., Hu G.-Q. Glucose biosensor based on multi-wall carbon nanotubes and screen printed electrodes. // Biosensors and Bioelectronics.–2005.–**21**, N 3.–P. 508–512.
6. Starodub N. F., Hustochka L. N., Lazarenko A. V. Bubryak O. A., Terentev A. G., El'skaya A. V. Integration of biological material in the electrochemical biosensor devices // Anal. Chem. USSR.–1990.–**45**, pt 2.–P. 1038–1044.
7. Kanukov V. N., Strekalovskaya A. D., Kil'kinov V. I., Bazarova N. V. Materials for modern medicine: Tutorial.–Orenburg: SOU GEA, 2004.–113 p.
8. Danyleyko L. V., Schuvailo O. N., Arkhypova V. M., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Development of amperometric enzyme biosensor based on carbon fibre electrode and immobilized glucose oxidase // Biopolym. cell.–2003.–**19**, N 1.–P. 76–80.
9. Schuvailo O. N., Danyleyko L. V., Arkhypova V. M., Dzyadevych S. V., El'skaya A. V., Cespuoglio R., Soldatkin A. P. Development of microbiosensors based on carbon fibre for *in vivo* determination of glucose, acetylcholine and choline // Biopolym. cell.–2002.–**18**, N 6.–P. 489–495.
10. Immobilised cells and enzymes. A practical approach / Ed. J. Woodward.–Moscow: Mir, 1988.–215 p.
11. Shkotova L. V., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Adaptation of amperometric enzyme biosensor for glucose analysis in wine // Ukr. Biochem. J.–2004.–**76**, N 3.–P. 114–121.
12. Davidova M. E., Kurova V. S., Cuhachyova M. V., Kupletskaya M. B., Riabov A. D., Netrusov A. I. Stability and catalytic properties of glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* G-15 // Herald MSU, set 2, Chemistry.–2002.–**43**, N 6.–P. 366–370.
13. Trevan M. D. Immobilized enzymes.–Moscow: Mir, 1983.–P. 47–51.

УДК 557.152.1+53.087.9:543.553

Надійшла до редакції 07.10.09

Рисунки до статті Білоіван О. А. та співавт.

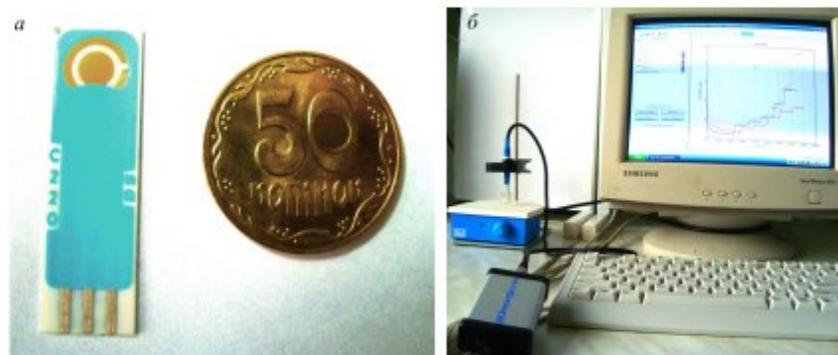


Рис. 1. Загальний вигляд триелектродного амперометричного датчика C220AT («DropSens», Іспанія) (а) та експериментальної установки, зібраної на базі приладу μ Stat 200 («DropSens») (б)

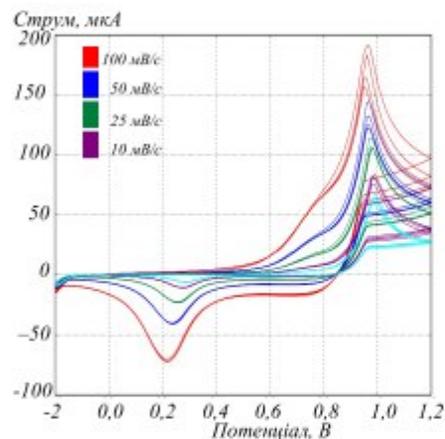


Рис. 2. Вольтамперні криві золотого електрода DropSens, отримані у 25 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) за різної швидкості розгортки потенціалу

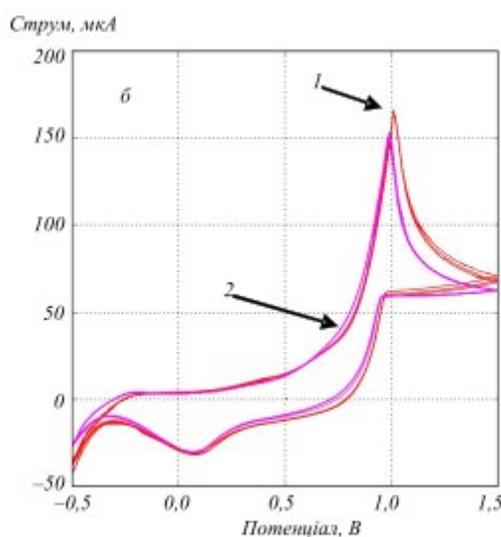
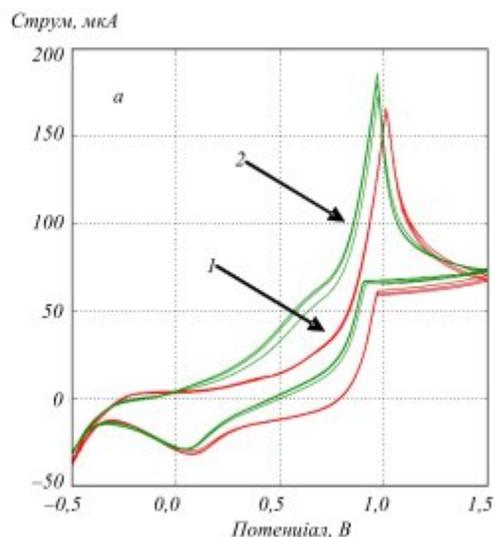


Рис. 3. Типові вольтамперні криві золотих електродів DropSens без ферментних мембран у 25 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) (а, б, криві 1) та після додавання 0,86 мМ H_2O_2 (а, крива 2) та 20 мМ глюкози (б, крива 2)

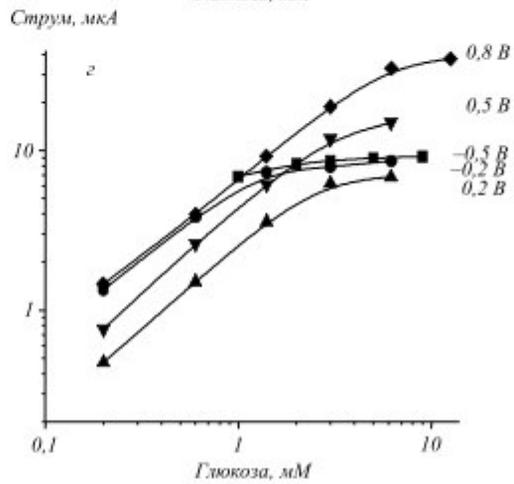
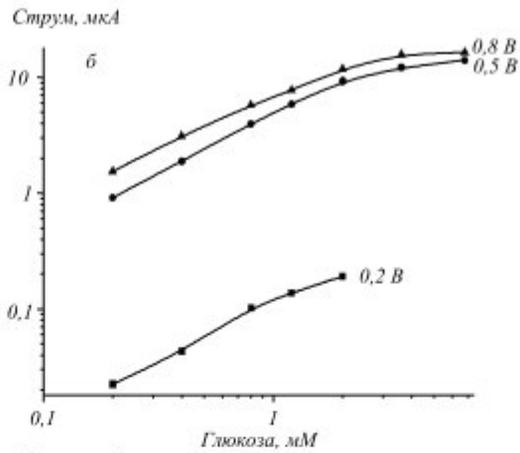
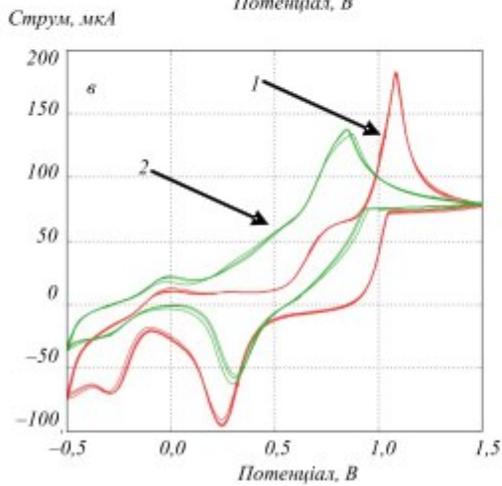
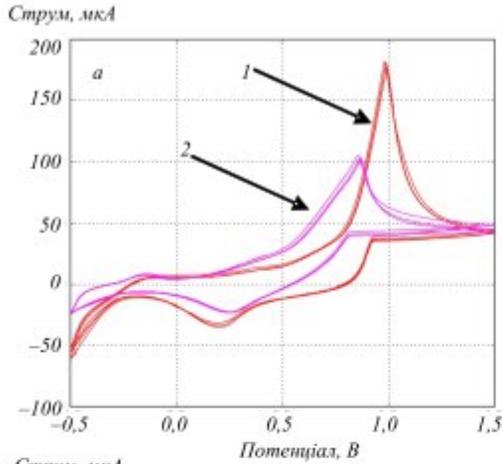


Рис. 6. Визначення оптимального потенціалу для вимірювання концентрації глюкози за допомогою біосенсора: а, б – на основі біоселективної мембрани ГОД– БСА; в, г – на основі біоселективної мембрани ГОД– БСА–БНТ (див. «Матеріали і методи») (1 – вольтамперограма, отримана у 25 мМ фосфатному буфері рН 7,0; 2 – у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за присутності 20 мМ розчину глюкози)