

Экспресс-диагностика мочевины в биологических жидкостях на основе нового полимерного датчика

Фомкина М.Г. , Грохлина Т.И.⁽¹⁾, Минкабирова Г.М. , Монтрель А.М. , Маевский Е.И.*

Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Учреждение Российской академии наук Институт математических проблем биологии РАН⁽¹⁾

142290 г. Пущино, Московская область, Институтская 3,

e-mail: mfomkina@mail.ru, 8(916)0394598

Резюме

Актуальность разработок сенсорных технологий, особенно в области медицины, обусловлена необходимостью избирательно, с высокой точностью контролировать концентрации веществ в различных жидкостях. В качестве природных датчиков обычно используются ферменты, молекулы-рецепторы и антитела (биосенсорные технологии). Научные направления работ по биосенсорам в мире сосредоточены не только на увеличении количества детектируемых веществ, а также на оптимизации работы приборов, путем повышения чувствительности и селективности датчиков, скорости анализов и обеспечения воспроизводимости результатов измерений. В существующих приборах-анализаторах, содержащих ферментативные биосенсоры, узким местом является потребление дорогостоящих очищенных ферментов.

На основе полимерных нанотехнологий нами разработаны биосенсоры, которые представляют собой комбинацию полиэлектролитных слоев и микрокапсул, содержащих фермент. Микрокапсулы с ферментом помещены между слоями полиэлектролитов, нанесенными на стеклянный рН-электрод. Этот метод иммобилизации ферментов позволяет многократно и в течение длительного времени использовать для измерения одни и те же молекулы фермента, помещенные в микрокапсулы полимерного покрытия. В настоящей работе представлены результаты экспериментов, демонстрирующие повышение чувствительности нового типа уреазного сенсора. Разработана программа расчета, обеспечивающая точное определение концентрации мочевины в биологических жидкостях с учетом их физико-химических свойств (рН, буферная емкость). Показано, что биосенсор на основе полимерных нанотехнологий может быть использован для экспресс-диагностики мочевины биологических жидкостей в клинической медицине.

Ключевые слова: биосенсор, анализ крови, уреазы, мочевины, полиэлектролиты, микрокапсулы, полимерные нанотехнологии, экспресс-диагностика

Express-diagnosis of urea concentration in the biological fluid by novel polymeric sensor

Fomkina M.G. , Grokhlina T.I.⁽¹⁾, Minkabirova G.M., Montrel A.M., Mayevsky E.I.*

Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Mathematical Problems of Biology RAS⁽¹⁾

142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya 3, e-mail: mfomkina@mail.ru

Summary

Relevance of sensor technology, especially in the medical field, due to the need selectively, with precise control of concentration of substances in various liquids. As sensors are commonly used natural enzymes, receptor molecules and antibodies (biosensor technology). The ways of biosensors investigations in the world are not only directed on increasing the number of detectable substances, as well as for optimize the operation of devices by improving the design, sensitivity and selectivity of the sensors, increasing the speed of analysis and reproducibility of measurements. In existing devices - analyzers containing enzymatic biosensors, the bottleneck is the use of expensive purified enzymes.

On the basis of polymeric nanotechnology, we have developed biosensors, which are a combination of the microcapsules containing the enzyme and polyelectrolyte layers. Microcapsules with the enzyme are placed between layers of polyelectrolytes deposited on a glass pH electrode. This method of enzyme immobilization allows for a long time use the same enzyme molecules for measure. This paper presents the results of experiments demonstrating the sensitivity of a novel type of urea sensor. A program for calculation provides an accurate determination of the concentration of urea in biological fluids based on their physical and chemical properties (pH, buffer capacity). It is shown that the biosensor based on polymeric nanotechnology can be used for rapid diagnostics of urea in biological fluids in clinical medicine.

Keywords: biosensor, blood analysis, urease, urea, polyelectrolytes, microcapsules, polymer nanotechnology, express- diagnosis

Введение

Необходимость в высокоселективных, долговечных, удобных в эксплуатации анализаторах обусловлена потребностями медицины, экологии, сельского хозяйства, пищевой промышленности. В частности, в клинической медицине необходимо проведение анализов, определяющих концентрации мочевины в моче и крови. Ранее нами был описан потенциометрический биосенсор, чувствительный элемент которого изготовлен на основе полимерных технологий [1, 2]. В качестве биодатчика ферментного сенсора было использовано микрочаистое полиэлектrolитное покрытие, содержащее уреазу, которое наносилось на стеклянный рН-электрод. Было установлено, что при работе с тестовыми растворами, биосенсор обеспечивает определение концентрации мочевины в диапазоне 2-20 мМ. Однако при адаптации работы сенсоров с реальными объектами, в частности с биологическими жидкостями, исследователи должны учитывать их особенности и физико-химические свойства.

Настоящее исследование было посвящено задачам повышения чувствительности уреазного полимерного сенсора; разработке программы расчетов при определении концентрации мочевины, учитывающей свойства биологических жидкостей (рН, буферная емкость, солевой состав); обеспечении экспресс-анализов для применения данного ферментного сенсора в клинической медицине.

Материалы и методы

В работе использовали лиофилизированную уреазу (ЕС 3.5.1.5) из бобов канавалии мечевидной (*Canavalia ensiformis*) фирм “Sigma” и “Fluka”, а также раствор уреазы из аналитического набора «Мочевина КТ(200)», (ЗАО «Диакон-ДС») с активностью 253000 Ед./л., буферы ТРИС, МЕС, ХЕПЕС (“Sigma”); мочевины о.с.ч. (Реахим). Соли CaCl_2 , Na_2CO_3 , KCl и NaCl имели градацию х.ч или ч.д.а. Полиэлектrolиты полиэтиленимин (мол. масса 600000 – 1000000), полиаллиламин гидрохлорид и полистиролсульфонат (все – “Aldrich”) с мол. массой 60 000 – 70 000 использовали в виде растворов в 0,33 М NaCl в концентрации 1 мг/мл. Все растворы солей готовили на бидистиллированной и деионизированной воде. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [3].

Способ создания чувствительного слоя был основан на полимерных нанотехнологиях. В качестве биодатчика применялся полимерный материал, состоящий из полиэлектrolитных слоев между которыми были заключены микрокапсулы из этих же

полиэлектролитов, содержащие функционально-активные молекулы уреазы [1,2]. Чувствительный слой наносился на шарик стеклянного рН-электрода, толщина полиэлектролитной оболочки, отделяющей молекулы фермента в микроячейках покрытия от исследуемого раствора, составляла десятки нанометров. Полимерная оболочка проницаема для низкомолекулярных веществ, например, для субстрата уреазы – мочевины и непроницаема для высокомолекулярных молекул фермента. Капсулированную и иммобилизованную уреазу получали по методике, описанной в [4], причем для получения органо-минеральных ядер использовали соосаждение фермента с CaCO_3 в процессе формирования составных сферолитов диаметром около 3-5 мкм.

Для измерения изменения концентрации ионов водорода использовался четырехканальный компьютерный интерфейс (АЦП) – «Рекорд 4. Ячейка, общим объемом 3мл, термостатировалась с помощью термостата U-1 (Германия). Температура экспериментальной среды составляла $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Перемешивание раствора осуществлялось с помощью магнитной мешалки.

Процедура измерения концентрации мочевины состояла в следующем. Вначале измерительная ячейка заполнялась аналитическим раствором, содержащим определенное количество низкомолекулярной соли и буфера. Затем в нее добавляли препарат фермента, в необходимых для решения текущей задачи количествах, или вводили модифицированный рН электрод. Далее после ~ 5 мин. инкубации при заданной температуре добавляли фиксированный объем раствора мочевины или биологической жидкости – мочи, сыворотки крови. Моча перед добавлением разводилась в дистиллированной воде в соотношении 1:100. Регистрируемый (в мВ) щелочной сдвиг рН выходил на насыщение примерно через 20-30 сек. Каждая представленная на графиках точка - результат 5-7 повторов. Сыворотку крови получали из биохимической лаборатории больницы Пущинского научного центра РАН. Концентрацию мочевины определяли обычным спектральным методом (больница ПНЦ РАН) и потенциометрическим способом с помощью модифицированного рН-электрода в один и тот же день.

Результаты и обсуждение

Использованное нами хемочувствительное покрытие было построено на основе двух типов известных молекулярных конструкций: полиэлектролитных мультислоев [5] и полиэлектролитных капсул, заполненных молекулами уреазы [6]. Их соединение в единую конструкцию образует новое, оригинальное ячеистое покрытие, устойчивое в

водно-солевой среде. Наличие нескольких, не менее 5-ти полиэлектролитных слоев, отделявших ферменты от внешней среды, предохраняло последние от инактивирования, например, посторонними ферментами или микробами. Одной из особенностей покрытия было то, что суммарная толщина полимерных слоев составляла в нем менее 2% от диаметра внутренних ячеек. Причем вклад в это толщины стенок полиэлектролитных капсул составлял, в свою очередь, 40-60%. Нанесенное покрытие было стабильно в водно-солевых растворах с ионной силой менее 1 М и в области рН от 3 до 9, что соответствует литературным данным по стабильности полиэлектролитных мультислоев [7].

Возможность измерения концентрации мочевины модифицированным стеклянным рН-электродом обусловлена следующими свойствами чувствительного покрытия: хорошей проницаемостью полиэлектролитных мультислоев для субстрата (мочевины) и продуктов его разложения уреазой; непроницаемостью этих слоев для фермента; сохранения ферментом, находящимся в ячейках покрытия, высокой активности; существенным защелачиванием среды при разложении мочевины на углекислый газ и аммиак.

На первом этапе своего исследования мы провели эксперименты по измерению концентрации мочевины в тестовых растворах с помощью фермента уреазы, иммобилизованного на поверхности стеклянного рН-чувствительного электрода по описанной выше методике получения ультратонкого полимерного покрытия с небольшими модификациями, которые позволили нам увеличить чувствительность уреазного сенсора. В ходе экспериментов по повышению чувствительности биосенсора изменялись следующие параметры: методика инкапсулирования и иммобилизации ферментов (концентрация фермента, количество слоев оболочки капсул, заряд и тип внутреннего слоя полиэлектролитной оболочки, контактирующего с ферментом); методика очистки чувствительного слоя от кальций карбонатных частиц (тип растворителя, время выдерживания в растворе, концентрация растворителя); свойства реакционной среды исследования (буферный состав, рН, ионная сила, тип соли). Как выяснилось, одним из решающих факторов, влияющих на чувствительность модифицированного рН-электрода является подбор условий для очистки микрокапсул с ферментом от кальций карбонатных частиц. В результате проведенных экспериментов нами были подобраны следующие условия: микрокапсулы с уреазой очищались от кальций-карбонатных частиц в 0,025М растворе ЭДТА при рН, доведенной до значения 7,5, в течение трех часов. Второй фактор, способствующий увеличению чувствительности сенсора, – это повышение концентрации фермента в капсулах полиэлектролитного

покрытия. Как известно, в реакционной среде с большим содержанием фермента (при одинаковой активности фермента) ответ электрода на введение субстрата более быстрый, что необходимо для экспресс-диагностики. Увеличение концентрации фермента в микрокапсулах полиэлектrolитного слоя достигалось за счет увеличения количества добавленного фермента в раствор CaCl_2 при получении составных кальций-карбонатных сферолитов. Третий фактор, непосредственно не касающийся свойств чувствительного слоя биосенсора, это состав реакционной среды исследования. Как было показано ранее [1] величина ответа модифицированного pH-электрода сильно зависит от буферной емкости (0,1-20 мМ буфера) реакционной среды и в гораздо меньшей степени от ионной силы раствора от 10 до 500 мМ NaCl или KCl. Область значений pH от 5,5 до 8,5, как мы предполагаем, является оптимальным диапазоном для исследований реакции разложения мочевины на аммиак и углекислый газ с помощью уреазного полимерного сенсора. Чувствительный слой биосенсора стабильный при этих значениях pH и фермент достаточно активен (оптимум pH для уреазы близок нейтральным значениям).

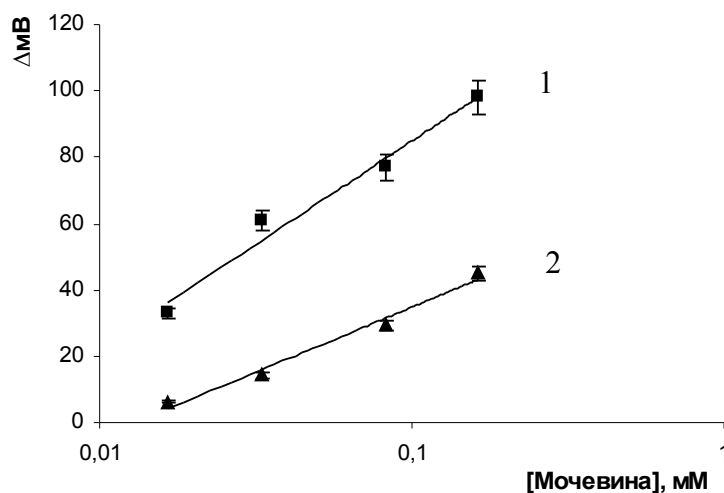


Рис. 1. Зависимость ответов pH-электродов от концентрации мочевины. Линия 1 – свободная уреазы, линия 2 - уреазы, иммобилизованная на поверхности стеклянного электрода. Поверхности покрытия и капсул заряжены положительно. Среда: буфер 1мМ MES, pH 5,8, 100мМ NaCl. Концентрация белка 3 мкг/мл.

Зависимости величины защелачивания среды от концентрации мочевины в анализируемом растворе для свободной уреазы (линия 1) и в составе ячеистого покрытия электрода (линия 2) показаны на рис.1.

Как видно из рисунка, активность уреазы после процедуры иммобилизации в полиэлектrolитное покрытие уменьшается и составляет 40-50% от активности свободного

фермента. Следует отметить, что это высокий показатель, потому что, по данным других авторов и по нашим первоначальным исследованиям [1, 8] активность ферментов, помещенных в полиэлектролитные капсулы, обычно снижалась в 6-7 раз, а во-вторых, ионы Ca^{++} , являющиеся ингибиторами уреазы, использовались при инкапсулировании фермента и могли сильно снизить активность фермента.

Таким образом, показано, что потенциометрическим методом с помощью нового типа полимерного уреазного сенсора возможно проводить измерения концентрации мочевины, начиная от 20 мкМ. Исследования стабильности нового типа уреазного сенсора показали, что при хранении его в дистиллированной воде при температуре 4°C, сенсор способен работать до 2 месяцев. При этом снижение активности иммобилизованной уреазы по сравнению с первоначальной составляет 40-50%.

Второй этап исследований был посвящен изучению возможности применения уреазного полимерного сенсора для определения мочевины в биологических жидкостях на примере мочи и крови. Моча каждого пациента отличается по солевому составу и значению pH. Поскольку концентрация мочевины в моче зависит от времени приема пищи и состава пищи, обычно определяют мочевины в моче, собранную за сутки, которая в норме для взрослого человека составляет 333,0 — 587,7 мМ/сут. [9]. В наших экспериментах в реакционной среде исследовалась моча, разведенная примерно в 1000 раз, поэтому физико-химические свойства мочи индивидуального пациента никак не влияли на результаты измерений. Сравнение экспериментальных данных, полученных с помощью модифицированного pH-электрода или по реакции разложения мочевины свободным ферментом, показали, что расхождения в определении концентрации мочи составляет менее 5 %. То есть, определение мочевины в моче с помощью ферментного полимерного электрода не сложнее, чем определение ее в тестовых растворах. Совсем другая картина наблюдается для крови. Концентрация мочевины в крови значительно ниже и составляет в норме для взрослого человека 2,5 — 8,3 ммоль/л [9]. Значения pH сыворотки крови индивидуальных пациентов в наших экспериментах различались в диапазоне 7,2-7,5 (n=32) (в норме pH крови составляет 7,35 — 7,47) [9]. Более того, оказалось, что каждый пациент имеет свою буферную емкость крови. При исследовании сыворотки крови с помощью ферментного pH-электрода в реакционной среде кровь разводилась примерно в 10 раз и ошибка экспериментов при определении мочевины была существенной (до 20-25%): изменения pH среды, вносимые добавкой сыворотки крови, фиксировались модифицированным pH-электродом наряду с изменениями pH в результате реакции разложения мочевины.

Для повышения точности определения концентрации мочевины в сыворотке крови нами был опробован метод «двойных добавок». Суть метода состояла в следующем. После фиксированной добавки анализируемой жидкости (сыворотки крови) в исследуемый раствор с известным объемом, в этот же раствор последовательно вносили 3 добавки мочевины с известной концентрацией. Все ответы модифицированного ферментного рН-электрода (в мВ) регистрировали и получали значения в четырех точках. Поскольку кривая зависимости ответа электрода от концентрации мочевины имеет S-образную форму (свойство иономерных электродов), то по следующей формуле:

$$f = \frac{ax^b}{c + x^b}, \text{ где } a, b, c - \text{const}$$

искали x_1 по экспериментально полученным значениям функции f (т.е. регистрируемые ответы электрода) в четырех точках - x_1, x_2, x_3, x_4 , где

$$x_2 = x_1 + \Delta_1$$

$$x_3 = x_1 + \Delta_2$$

$$x_4 = x_1 + \Delta_3$$

Значения Δ_i , т.е. значения добавок мочевины, были заданы. Параметры функции a, b, c вычисляются программой методом квадратичных отклонений результатов расчета от наблюдаемых значений в этих 4-х точках. Время, потраченное программой на нахождение x_1 , после получения значений функции f в четырех точках, составляет около секунды в зависимости от заданного числа вычислений ($n = 100$).

Отработка результатов проводилась с помощью известных концентраций мочевины в растворах с различной буферной емкостью и различным значением рН. Проверка работы биосенсора и программы расчетов проводилась на сыворотке крови с известной концентрацией мочевины, полученной стандартным спектральным методом в биохимической лаборатории поликлиники РАН г. Пущино.

На рис.2 представлен график зависимости ответа электрода (мВ) от концентрации мочевины (мм) и расчетная кривая для одного из экспериментов. Экспериментальные значения, полученные в четырех точках, составляют $y_1=14,70$; $y_2=32,70$; $y_3=43,00$; $y_4=46,30$. Параметры кривой вычисленные программой после 100 приближений имеют следующие значения: $a=49,66$; $b=1,27$; $c=1,05$, $x_1 = 0,53$

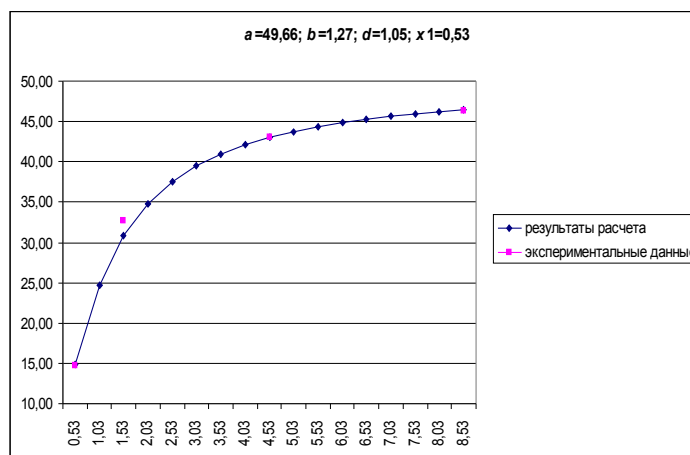


Рис.2 График зависимости ответа рН-электрода (мВ) при внесении фиксированной добавки сыворотки крови и известных значений мочевины. Ось x – концентрация мочевины (мМ), ось y – значения функции f или ответ электрода (мВ).

Поскольку сыворотка крови при добавлении в измерительную ячейку разводилась в 10 раз, то получаем расчетное значение концентрации мочевины в крови пациента - 5,3 мМ, которое в данном случае совпало со значением концентрации мочевины для этого пациента, определенное биохимической лабораторией больницы ПНЦ РАН. Для других измерений на сыворотке крови ($n=6$) отклонения значений концентрации мочевины, вычисленных с помощью программы и определенных стандартным методом, не превышали 7%.

Как видно из приведенных данных, с помощью этого метода можно проводить измерения концентрации мочевины в сыворотке крови. При этом достоверный результат получается при различных значениях рН и буферной емкости крови. Предварительная калибровка электрода в этом случае не нужна, поскольку электрод автоматически калибруется внесением известных добавок мочевины. Все измерения вместе с подготовкой к эксперименту и расчетами составляют примерно 5-10 мин., что является вполне удовлетворительным показателем для экспресс-диагностики.

Таким образом, показано, что уреазный биосенсор на основе нового микрочаеистого полиэлектролитного покрытия пригоден для измерений мочевины в биологических жидкостях таких как сыворотка крови и моча. При этом стабильная работа биосенсора обеспечивается без замены чувствительного слоя до 2 месяцев.

Список литературы

1. Терновский В.И., Чернохвостов Ю.В., Фомкина М.Г., Монтрель М.М. // Биофизика – 2007. - Т.52. - №5. - С.825-829.
2. Монтрель М.М., Терновский В.И., Фомкина М.Г., Петров А.И.//Патент на изобретение № 2333231, Бюлл. № 25, 2008г.
3. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – V.72. – P.248
4. Sukhorukov G.B, Volodkin V.D., Gunther A.M., Petrov A.I., Shenoy D. B., Mohwald H. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. - J. Mater. Chern., 2004, v. 14, p. 2073 2081.
5. Radtchenko I.L., Sukhorukov G.B., Mõhwald H. // Colloids Surf. A, 2002, V. 202, P. 127 .
6. Sukhorukov G.B., Feigin L.A., Montrel M.M., Sukhorukov B.I. // Thin Solid Films, 1995, V. 259, P. 79-84.
7. Bertrand P., Jonas A., Laschewsky A., Legras R. // Macromol.Rapid Commun., 2000. V.21. P.319-348.
8. Сухоруков Б. И., Тихоненко С. А., Сабурова Е. А., Дубровский А. В., Дыбовская Ю. Н., Шабарчина Л. И. // Биофизика. - 2007. - Т. 52, N 6. - С.1041-1048
9. Цыганенко А. Я., Жуков В. И., Мясоедов В. В., Завгородний И. В. // Клиническая биохимия — Москва, «Триада-Х», 2002 г.

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской федерации, государственный контракт № П 1417 от 03.09.2009 г., в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.