



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86777** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/00
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

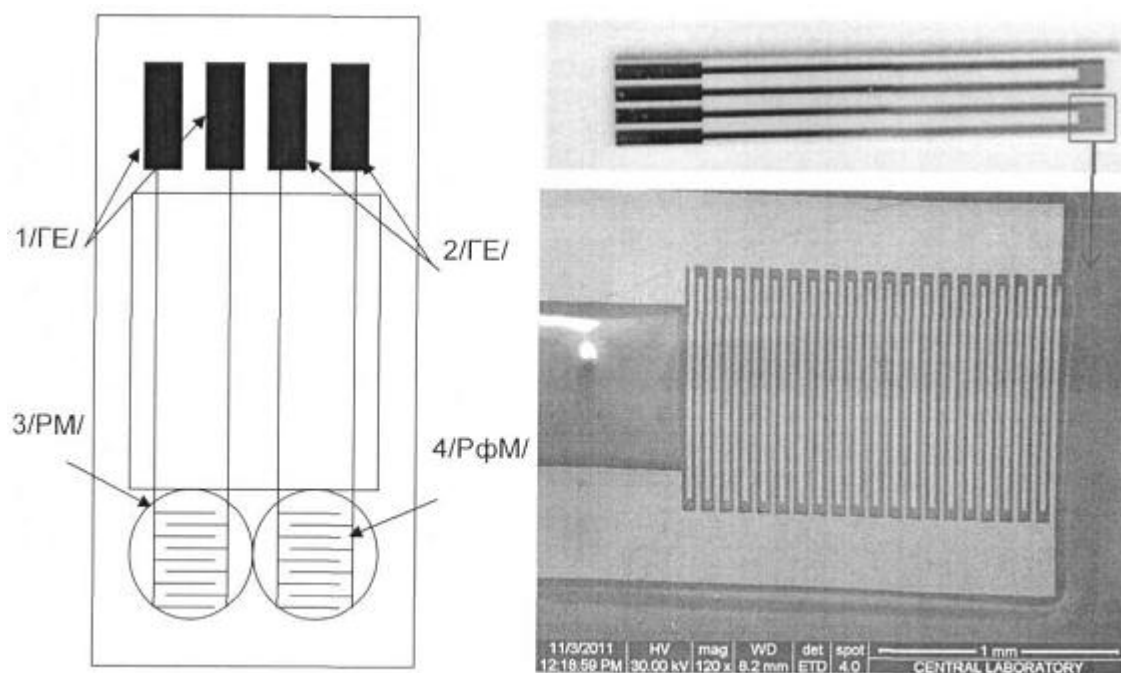
(21) Номер заявки: u 2013 08721	(72) Винахідник(и): Солдаткін Олександр Олексійович (UA), Марченко Світлана Володимирівна (UA), Величко Тарас Павлович (UA), Солдаткін Олексій Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.07.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2014, Бюл.№ 1	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Ак. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363

(54) КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ УРЕАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СЕЧОВИНИ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

(57) Реферат:

Кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазі для визначення концентрації сечовини у водних розчинах складається з двох пар золотих гребінчастих електродів, на першу пару з яких нанесена робоча мембрана на основі рекомбінантної уреазі, селективної до сечовини, на другу пару електродів нанесена референтна мембрана. Біосенсор призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

UA 86777 U



Φir. 1

Корисна модель належить до галузі медицини та охорони здоров'я, і може бути використана з метою перевірки функціональності нирок, печінки, а саме для визначення концентрації сечовини під час процедури гемодіалізу та в сироватці крові хворих на ниркову недостатність, а більш конкретно до кондуктометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах.

Сечовина - це головний і кінцевий продукт обміну білків, синтез якої відбувається в печінці з діоксиду вуглецю та амонію в результаті дезамінування амінокислот. З печінки сечовина потрапляє в кров, а далі в нирки, де і відбувається її фільтрація та виведення з сечею [1]. Фізіологічний рівень сечовини знаходиться в межах 2,5-7,5 мМ залежно від харчування [2]. Дуже високий рівень сечовини в сироватці крові пов'язаний з тяжкою нирковою дисфункцією і називається синдромом уремії. В такому випадку необхідно проводити гемодіаліз чи трансплантацію нирки. Значне підвищення концентрації сечовини спостерігається під час хронічної та гострої форм ниркової недостатності (50-70 та 120-150 мМ відповідно). Такий патологічний рівень сечовини можна понизити до 10 мМ за рахунок гемодіалізу чи перитоніального діалізу. Рівень сечовини у діалізаті може варіювати від 3 до 16 мМ [3].

Для моніторингу сечовини найчастіше використовують колориметричні методи аналізу [4, 5]. Для сечовини колориметричними реагентами є діацетилмонооксим, фталальдегід, нафтилетилендіамін, хромотропова кислота [6]. Всі ці методи складні у використанні: необхідний контроль температури, рН, що значно сповільнює аналіз.

Окрім колориметричного визначення сечовини, існує друга група методів більш специфічних, які ґрунтуються на ферментативних реакціях з колориметричною детекцією. Всі сучасні ферментативні методи ґрунтуються на використанні ферменту уреазы. Метод складається з двох етапів. На першому при гідролізі сечовини утворюється іон амонію, концентрацію якого (другий етап) визначають з використанням послідовних ферментативних реакцій, потенціометричних методів чи технології "сухої хімії" [7]. Не зважаючи на те, що ферментативні оптичні методи є специфічними і чутливими, їх застосування для визначення сечовини обмежене нестійкістю ферментів при зберіганні та експлуатації, складністю методики аналізу, а також високою вартістю обладнання і затратних матеріалів, крім того необхідна наявність висококваліфікованого персоналу.

На сьогоднішній день створено цілу низку уреазних біосенсорів, де як чутливий елемент є фермент уреазы: амперометричних [8], потенціометричних [9], кондуктометричних [10] та оптичних [11]. Але, не зважаючи на бурхливий розвиток біосенсорів для моніторингу сечовини, автори дуже рідко підкреслюють недоліки, пов'язані з їх практичним застосуванням. Головним недоліком таких біосенсорів є вузький лінійний діапазон визначення, тому перед вимірюванням необхідно значно розводити біозразки.

В роботі [10] описано кондуктометричний біосенсор на основі звичайної уреазы для визначення сечовини, що складається з двох електродів на основі вольфраму, покритих полімерною плівкою, на один з яких наноситься ферментна мембрана на основі звичайної уреазы селективної до сечовини. Він характеризується лінійним діапазоном роботи, зміщеним до низьких концентрацій, порівняно з біосенсорами на основі рекомбінантної уреазы. Відповідно при роботі з таким біосенсором необхідно сильно розводити пробу, що призводить до великої похибки вимірювання.

В роботі [12] описано відомий потенціометричний біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів та рекомбінантної уреазы для визначення сечовини. Він складається з потенціометричного перетворювача на основі іон-селективних польових транзисторів, відповідно, його подальше масове виробництво буде більш коштовним порівняно з біосенсорами на основі дешевих кондуктометричних перетворювачів. Крім цього даний потенціометричний біосенсор характеризується повільними відгуками на субстрат порівняно з кондуктометричними біосенсорами, що витікає у більші затрати часу на проведення всього аналізу.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого кондуктометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини, який би дозволив більш швидко визначати концентрацію сечовини та був би більш перспективним та дешевим для подальшого масового виробництва.

Поставлена задача вирішується запропонованим кондуктометричним біосенсором на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах, який, відповідно до корисної моделі, складається з двох пар золотих гребінчастих електродів, на першу пару з яких нанесена робоча мембрана на основі рекомбінантної уреазы, селективної до сечовини, на другу пару електродів нанесена референтна мембрана, а вказаний біосенсор

призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

Використання в роботі запропонованого біосенсора на основі кондуктометричного перетворювача дозволило проводити більш швидкий аналіз біозразків, а сам біосенсор став більш перспективним та більш дешевим для подальшого виробництва. В іншу чергу застосування в складі біоселективного елемента біосенсора рекомбінантної уреазы підвищило точність аналізу.

В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення сечовини лежить наступна ферментативна реакція:

Рекомбінантна уреаза
 $\text{Сечовина} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$.

В процесі проходження ферментативної реакції рекомбінантна уреаза розщеплює сечовину, при цьому змінюється концентрація заряджених іонів в робочій мембрані, яку і можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [13].

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

на фіг. 1 показано схематичний та реальний зовнішній вигляд кондуктометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах;

на фіг. 2 показана блок-схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань;

на фіг. 3 наведено калібрувальні графіки залежності величини відгуків біосенсорів на основі звичайної та рекомбінантної уреазы від концентрації сечовини;

на фіг. 4 продемонстровано принцип роботи кондуктометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы для визначення сечовини на реальному прикладі проведення експерименту.

Кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах складається з двох золотих гребінчастих пар електродів 1 та 2 /ГЕ/ (фіг. 1). На одну пару електродів 1 /ГЕ/ нанесена робоча мембрана 3 /РМ/. На другу пару електродів 2 /ГЕ/ нанесена референтна мембрана 4 /РфМ/. Згаданий біосенсор підключений до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань (фіг. 2). Робоча мембрана 3 /РМ/ містить у собі фермент рекомбінантну уреазу, селективну до впливу сечовини. Експериментальна установка для кондуктометричних вимірювань [13] містить блок для реєстрації сигналів біосенсора 5 /РБ/, низькочастотний генератор сигналів 6 /ГС/ (типу ГЗ-118 /Україна/), входи якого підключені до відповідних електродів кондуктометричного біосенсора. Виходи генератора сигналів 6 /ГС/ підключені до входу фазочутливого нановольтметра 7 /НВ/. Виходи нановольтметра 7 /НВ/ підключені до реєстраційного блоку 5 /РБ/, призначеного для реєстрації сигналів з біосенсора. Окрім цього установка забезпечена опорами навантаження 9 /ОН/, призначеними для відображення сигналів з відповідних пар електродів. При цьому входи нановольтметра 7 /НВ/ через диференційний підсилювач 8 /ДП/ підключені до відповідних пар електродів біосенсора, які розташовані у вимірювальній комірці 10 /К/.

Пропонований кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах працює так.

На робочу поверхню однієї пари електродів 1 /ГЕ/ кондуктометричного біосенсора наносили вихідну суміш для створення робочої мембрани 3 (об'єм 30 нл), яку вносили в пари глутарового альдегіду (ГА) на 10-40 хвилин. Цю робочу мембрану готували із 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

3-5 - рекомбінантна уреаза,
 3-6 - сироватковий альбумін бика (БСА),
 8-18 - гліцерин.

На другу пару електродів 2 /ГЕ/ наносили вихідну суміш для створення референтної мембрани 4 (30 нл), яку вносили в ГА на 10-40 хвилин, цю мембрану формували з 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

6-12 - БСА,
 8-18- гліцерин.

З генератора 6 /ГС/ на диференційні пари електродів 1 та 2 /ГЕ/ біосенсора, що знаходяться в комірці 10 /К/ з розчином, що досліджується, подавали змінну напругу з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ. При цьому із згаданих електродів 1 та 2 /ГЕ/ отримували сигнали, які знімалися з опорів навантаження 9 /ОН/ ($R_n = 1 \text{ кОм}$) та надходили через диференційний підсилювач /типу Unipan-233-6 (Польща)/ 8 /ДП/ до селективного нановольтметра /типу Unipan-233 (Польща)/ 7 /НВ/. Після нановольтметра 7 /НВ/ сигнал подавали до реєстраційного блоку 5

/РБ/ для реєстрації сигналу біосенсора, в якому відбувалося перерахування даних та отримання сигналу, який відповідає концентрації сечовини у досліджуваному розчині.

Пропоновану систему використовували так. Попередньо виготовляли біоселективні мембрани. Створення біосенсора: виготовляли робочу мембрану 3 /РМ/. Для цього готували розчин з вмістом 5 % рекомбінантної уреазы, 5 % БСА та 10 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері. рН 7,4. Референтну мембрану 4 /РфМ/ виготовляли таким же чином, але, замість наважки ферменту, брали лише 10 % БСА. Гліцерин у складі мембран 3 /РМ/, 4 /РфМ/ використовувався для стабілізації ферменту при іммобілізації та запобігання передчасного підсихання розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. В свою чергу, БСА в складі робочої мембрани 3 відігравав роль стабілізуючого агенту для ферменту.

Для створення мембран біосенсора, відповідно, 3 /РМ/ та 4 /РфМ/, краплю ферментної суміші (30 нл) наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача 1 /ГЕ/, а на іншу 2 /ГЕ/ - референтний розчин на основі лише БСА без ферменту. Для іммобілізації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду (ГА) на 10-40 хв. і потім підсушували на повітрі й відмивали від надлишку ГА у буферному розчині протягом 10-15 хв.

Протокол біосенсорного аналізу сечовини в модельних розчинах. Перед початком роботи датчики з іммобілізованими мембранами деякий час (приблизно 10-15 хв.) відмивали від надлишків нез'язаного ГА до стабілізації базової лінії. Концентрацію субстрату змінювали, додаючи певні аліквати вихідних концентрованих розчинів сечовини. Після отримання кожного відгуку біосенсор відмивали від продукту, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази кожні 2 хв. Шляхом додавання різної кількості модельних розчинів сечовини було побудовано калібрувальну криву для визначення концентрації сечовини (фіг. 3). Для порівняння на фіг. 3 також зображена калібрувальна крива біосенсора на основі звичайної уреазы, яка характеризувалась іншим лінійним діапазоном визначення. Час за який було отримано один біосенсорний відгук складав 70-90 секунд (фіг. 4), що в 5 разів швидше ніж, у відомого потенціометричного біосенсора - 210 секунд [12].

Визначення концентрації сечовини в аналізованих зразках діалізату та крові здійснювали за калібрувальною кривою. Додавали аліквоту проби до вимірювальної комірки та отримували відгуки. Далі за калібрувальними кривими вираховували концентрацію сечовини в невідомій пробі. За умов подальшої стандартизації запропонованого кондуктометричного біосенсора на основі рекомбінантної уреазы для визначення концентрації сечовини у водних розчинах ціна аналізу однієї проби діалізату або крові буде щонайменше, у 4 рази дешевше, ніж у відомих біосенсорів.

З прикладу роботи біосенсора та за допомогою калібрувальної кривої (фіг. 3) і типових сигналів біосенсора (фіг. 4) видно, що запропонований кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазы є функціонально придатним і дозволяє набагато швидше та дешевше отримувати результати аналізу сечовини в реальних розчинах порівняно з відомими біосенсорами.

Джерела інформації:

1. Березов Т.Т., Коровин Б.Ф., Биологическая химия. - М.: Медицина, 1998. - С. 448-451.
2. Dhawan G., Sumana G., Malhotra B.D., Recent development in urea biosensors // Biochemical Engineering Journal. - 2009. - Vol. 44. - P. 42-52.
3. Koncki R., Recent development in potentiometric biosensors or biomedical analysis // Analytica Chimica Acta. - 2007. - Vol. 599. - P. 7-15.
4. Bhusana Premanode, Chris Toumazou, A novel, low power biosensor or real time monitoring of creatinine and urea in peritoneal dialysis // Sensor and Actuators B. - 2007. - Vol. 120. - P. 732-735.
5. Anna Radomska, Robert Koncki, Krystyna pyrzyńska, Stanisław Glab, Bionalytical system or control of hemodialysis treatment based on potentiometric biosensor or urea and creatinine // Analytica Chimica Acta. - 2004. - Vol. 523. - P. 193-200.
6. Jurkiewicz M., Alegret S., Almirall J., Garcia M, Fabregas E., Development of a biparametric bioanalyser or creatinine and urea. Validation of the determination of biochemical parameters associated with hemodialysis // Analyst. - 1998. - Vol. 123. - P. 1321-1327.
7. http://www.terramedica.spb.ru/ld4_2007/slepishiva.htm.
8. Stred'ansky M., Pizzariello A., Stred'anska S., Miertus S., Amperometric pH-sensing biosensor for urea, penicillin, and oxalacetate // Analytica Chimica Acta. - 2000. - Vol. 415. - P. 151-157.
9. Rajesh V. Bisht, Takashima W., Kaneto K., Development of a potentiometric urea biosensor based on copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film // React. Funct. Polym. - 2005. - Vol. 62. - P. 51-59.

10. Castillo-Ortega M.M., Rodriguez D.E., Encinas J.C., Plascencia M., Mendez-Velarde F.A., Olayo R., Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites // Sens. Actuators B. - 2005. - Vol. 85. - P. 19-25.

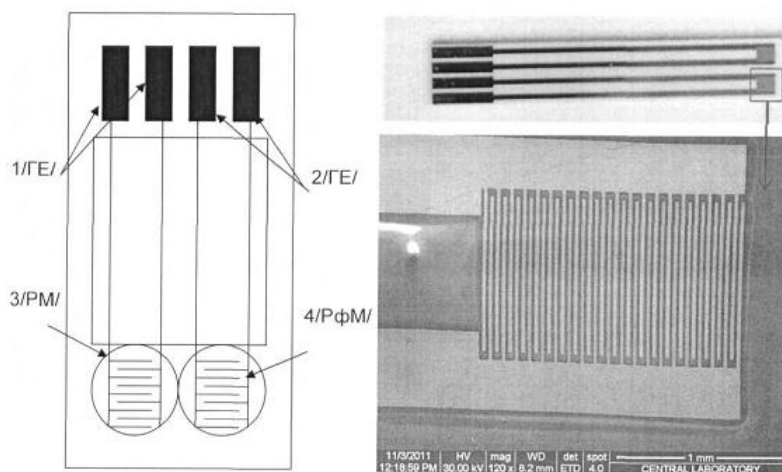
11. Koncki R., Lenarczuk T., Radomska A., Glab S., Optical biosensor based on Prussian Blue films // Analyst. - 2001. - Vol. 126. - P. 1080-1085.

12. A.P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C Martelet, N. Jaffrezic-Renault, A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs // Biosensor and Bioelectronics. - 2003. - Vol. 19. - P. 131-135.

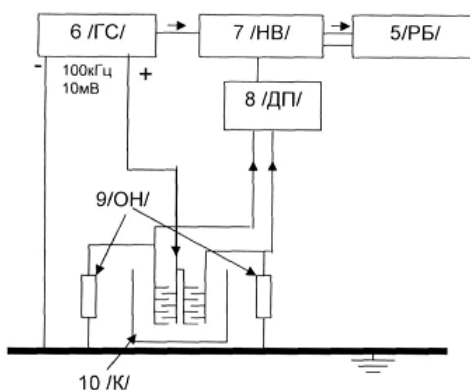
13. Дзядевич С.В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. // Біополімери і клітина - 2005. - С. 91-106.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

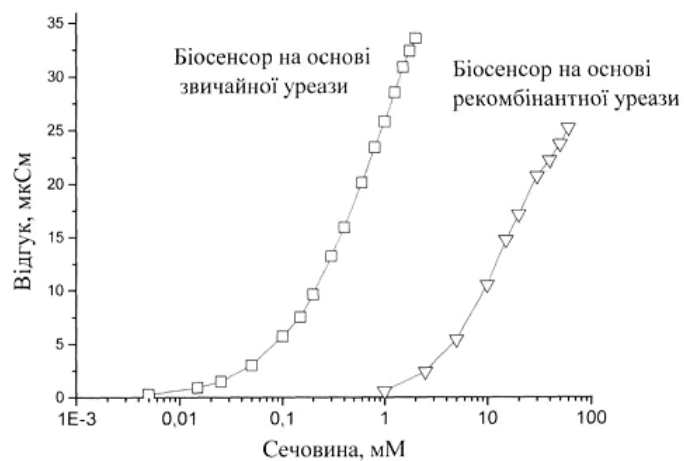
15 Кондуктометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазі для визначення концентрації сечовини у водних розчинах, який **відрізняється** тим, що складається з двох пар золотих гребінчастих електродів, на першу пару з яких нанесена робоча мембрана на основі рекомбінантної уреазі, селективної до сечовини, на другу пару електродів нанесена референтна мембрана, а вказаний біосенсор призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.



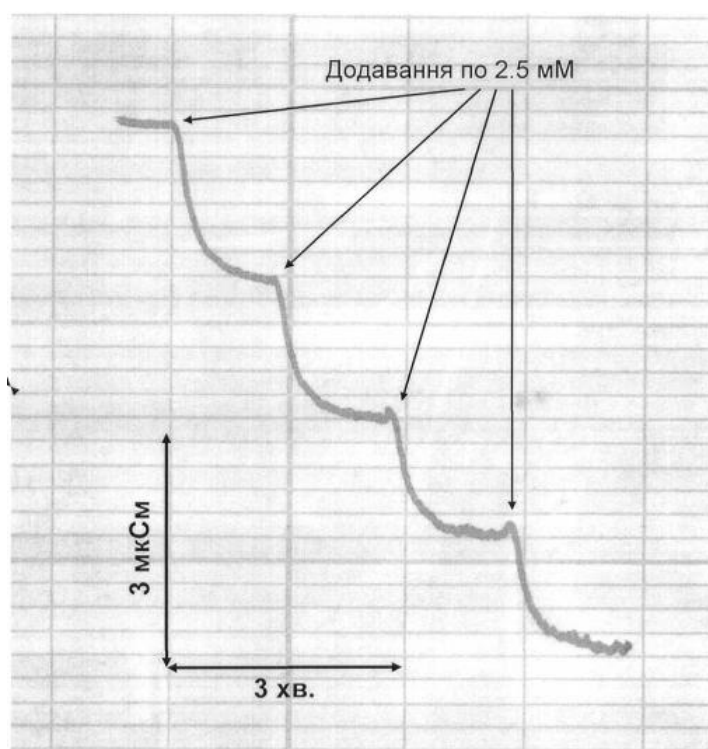
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601