



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112141** (13) **C2**
(51) МПК**G01N 33/48** (2006.01)**G01N 27/26** (2006.01)**C12Q 1/25** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2015 06793**
(22) Дата подання заявки: **09.07.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.07.2016**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.01.2016, Бюл.№ 2**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.07.2016, Бюл.№ 14**

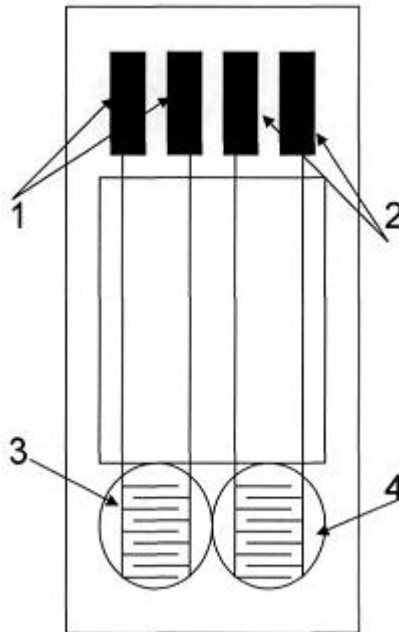
- (72) Винахідник(и):
Кучеренко Іван Сергійович (UA),
Кучеренко Дар'я Юріївна (UA),
Солдаткін Олександр Олексійович (UA),
Дзядзевич Сергій Вікторович (UA),
Солдаткін Олексій Петрович (UA),
Берна Озансой Касап (TR),
Салих Канн Кірдесілер (TR),
Буржу Аката Курч (TR)
- (73) Власник(и):
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І
ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
- (74) Представник:
Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
O.O. Soldatkin, O.M. Schuvailo, S. Marinesco, R. Cespuglio, A.P. Soldatkin. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection // Talanta, V.78, 2009, P.1023-1028
Дзядзевич С В. Кондуктометричні ферментні біосенсиори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина. - 2005. - Т. 21, №2 - С. 91-106
A.P. Soldatkin, S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, V.N. Arkhipova, G.A. Zhylyak, S.A. Piletsky, T.A. Sergeeva, T.L. Panasyuk, A.V. El'skaya. Biosensors based on conductometric detection // Биополимеры и клетка. - 1998. - Т. 14, № 4 - С. 268-276
US 4072576 A, 07.02.1978
UA 78106 U, 11.03.2013
UA 43335 U, 10.08.2009

(54) КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ГЕКСОКІНАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ**(57) Реферат:**

Пропонований винахід належить до галузі біотехнології та молекулярної біології і може бути використаний, зокрема, для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) в біотехнологічних зразках та наукових препаратах, а більш конкретно до кондуктометричних

UA 112141 C2

біосенсорів (КБ). КБ складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази, чутлива до аденозин-5'-трифосфату, на другу нанесена референтна мембрана на основі сироваткового альбуміну бика. Робочі області біосенсора знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину. Виходи електродів під'єднані до кондуктометричної установки, яка в свою чергу під'єднана до персонального комп'ютера. Використання даного винаходу дозволить більш селективно та більш точно визначати АТФ у розчинах.



Фіг. 1

Пропонований винахід належить до галузі біотехнології та молекулярної біології і може бути використаний, зокрема, для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату в біотехнологічних зразках та наукових препаратах, а більш конкретно до кондуктометричного біосенсора на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах.

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) є нуклеозидтрифосфатом, що складається з аденіну, рибози та трьох залишків фосфорної кислоти. АТФ слугує тимчасовим переносником енергії в усіх живих клітинах, тому він є поширеною речовиною в будь-якому організмі. В клітинах відбувається одночасне утворення нових молекул АТФ (під час розпаду органічних речовин) та використання АТФ (розщеплення до АДФ та фосфатної групи) під час біосинтетичних процесів. Також АТФ є одним з джерел енергії для функціонування насосів у клітинній мембрані, попередником важливого вторинного посередника - циклічного аденозинмонофосфату, алостеричним регулятором низки білків тощо [1,2].

Визначення концентрації АТФ дозволяє оцінити енергетичний стан клітин та тканин. Перспективним є використання АТФ для діагностики хвороб серцевого м'язу. Також, визначення АТФ може бути корисним в медицині для вивчення біохімічних процесів, в яких він бере участь, а саме: регулювання скорочення м'язів і агрегація тромбоцитів, підтримка судинного тону, нейротрансмісія та регуляція діяльності нервової системи. Зміна концентрації АТФ може впливати на вивільнення трансмітерів, синаптичну пластичність, взаємодію нейроглії, цикли сну і неспання, респіраторні та локомоторні ритми; викликати тривогу, депресію та агресію [3, 4]. Крім того, визначення концентрації АТФ може бути ефективно використане при розробці ліків, зокрема таких, що базуються на інгібіторах кіназ.

Найдавнішим методом визначення концентрації АТФ є люциферазний метод, який полягає у вимірюванні світла, яке випромінюється ферментом люциферазою при розщепленні АТФ [5]. Цей метод є селективним та відносно чутливим, але його недоліком є обмежені можливості щодо вимірювань в режимі реального часу та *in vivo*. Сучасні стандартні методи високоточного визначення АТФ, такі як спектрофотометрія та рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність в досить складній попередній підготовці проб для аналізу [6, 7]. Флуоресцентні, біо- та хемілюмінесцентні методи позбавлені частини наведених недоліків, проте також часто не відповідають потребам моніторингу АТФ [8]. Тому сьогодні дуже актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту АТФ в біотехнологічних та дослідницьких зразках.

На сьогодні існує ряд лабораторних біосенсорів для визначення АТФ. В їх основі лежать рН-чутливі польові транзистори [9], амперометричні скловуглецеві електроди [10], амперометричні платинові мікроелектроди [11]. Відомі біосенсиори на основі фотодетекції зв'язування АТФ з різними рецепторними молекулами [12, 13, 14]. Недоліками ряду створених біосенсорів є складна будова електрода [9, 10], що обумовлює високу собівартість виготовлення таких біосенсорів. Методика вимірювання концентрації АТФ афінними біосенсорами не дозволяє проводити вимірювання концентрації АТФ у реальному часі [10, 12, 14]. Суттєвим недоліком відомих біосенсорів є вплив інтерферентів на вимірювання, оскільки одночасно відбувається отримання сигналів, що викликаються АТФ та інтерферентами. Крім того, для деяких біосенсорів селективність та вплив інтерферуючих речовин були недостатньо досліджені [12, 13, 14].

Відомий амперометричний біосенсор для визначення концентрації АТФ у водних розчинах, який має один амперометричний електрод, на який нанесена робоча мембрана на основі глюкозооксидази-гексокінази, а сам біосенсор призначений для підключення до амперметричної установки [15]. Однак, описаний пристрій є складний за будовою та через чутливість до глюкози менш селективним.

В основу запропонованого винаходу поставлено задачу створення такого кондуктометричного біосенсора на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах, який би базувався на простих за структурою кондуктометричних перетворювачах і дозволив би більш селективно та більш точно визначати АТФ у розчинах.

Поставлена задача вирішується запропонованим кондуктометричним біосенсором на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах, що складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази чутлива до аденозин-5'-трифосфату, на другу нанесена референтна мембрана на основі сироваткового альбуміну бика, робочі області біосенсора

знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину, виходи електродів під'єднані до кондуктометричної установки, яка в свою чергу під'єднана до персонального комп'ютера.

В основі роботи кондуктометричного біосенсора на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах лежить ферментативна реакція фосфорилування глюкози, що протікає в ферментативній мембрані, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем:

ГЕК

$D\text{-глюкоза} + \text{АТФ} \rightarrow D\text{-глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ} (1),$

де ГЕК - гексокіназа.

Після додавання до робочої комірки досліджуваного зразка, в робочому буфері опиняється АТФ і інтерферуючі речовини. За відсутності в розчині глюкози, відгук біосенсора пропорційний концентрації інтерферуючих речовин. Після додавання до робочого розчину глюкози, в мембрані біосенсора починається реакція (1) і, як наслідок, генерується відгук біосенсора, який пропорційний концентрації АТФ.

Суть пропонованого винаходу пояснюється кресленнями, де на фіг. 1 схематично показано кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах; на фіг. 2 показана блок-схема кондуктометричної установки; на фіг. 3 продемонстровано принцип роботи кондуктометричного біосенсора на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах на реальному прикладі проведення експерименту; а на фіг. 4 наведено калібрувальний графік залежності відгуку біосенсора від концентрації аденозин-5'-трифосфату.

Кондуктометричний біосенсор для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах складається з двох пар електродів 1 та 2 (фіг. 1). На одну пару електродів 1 нанесена робоча одноферментна мембрана 3. На другу пару електродів 2 нанесена референтна мембрана 4. Згаданий біосенсор підключений до кондуктометричної установки (фіг. 2). Робоча мембрана 3 містить у собі фермент гексокіназу. Кондуктометрична установка 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 блока 5 /РБ/, призначеного для реєстрації сигналів з біосенсора. Окрім того, установка забезпечена опорами навантаження 8 /ОН/, призначеними для зняття сигналів з відповідних пар електродів. При цьому входи нановольтметра 7 /НВ/ через диференційний підсилювач 9 /ДП/ підключені до відповідних пар електродів біосенсора, які розташовані у вимірювальній комірці 10 /ВК/.

Пропонований кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) у водних розчинах працює так.

На робочу поверхню однієї пари електродів 1 кондуктометричного біосенсора наносили вихідну суміш для створення робочої мембрани 3 (об'єм 100 нл), після чого електроди залишали на повітрі за кімнатної температури для проведення іммобілізації на 20-30 хвилин. Цю робочу мембрану готували із 20 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

10 гексокінази (ГЕК)

5 сироватковий альбумін бика (БСА)

10 гліцерин

0,4 глутарового альдегіду.

На другу пару електродів 2 наносили вихідну суміш для створення референтної мембрани 4 (100 нл), яку залишали на повітрі за кімнатної температури на 20-30 хвилин, цю мембрану формували з 20 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

15 БСА,

10 гліцерин,

0,4 глутарового альдегіду

З генератора 6 на електроди біосенсора 1 та 2, що утворюють диференційну пару і знаходяться в комірці 10 з розчином, що досліджується, подавали змінну напругу з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ. При цьому із згаданих електродів 1 та 2 отримували сигнали, які знімалися з опорів навантаження 9 ($R_n=1 \text{ кОм}$) та надходили через диференційний підсилювач /типу Unipan-233-6 (Польща)/8 до селективного нановольтметра /типу Unipan-233 (Польща)/7. Після нановольтметра 7 сигнал подається до реєстраційного блока 5 для реєстрації сигналу біосенсора кондуктометричної вимірювальної установки, в якій відбувалося перерахування

даних та отримання сигналу, який відповідає концентрації поверхнево активних речовин у досліджуваному водному розчині.

Пропоновану систему використовували наступним чином. Попередньо виготовляли біоселективні мембрани. Створення ферментного біосенсора: виготовляли робочу мембрану 3. Для цього готували розчин з вмістом 10 % ГЕК, 5 % БСА та 10 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Референтну мембрану 4 виготовляли таким же чином, але замість наважки фермента брали лише 15 % БСА. Гліцерин у складі мембран 3, 4 використовувався для стабілізації ферменту при іммобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. В свою чергу, БСА в складі робочої мембрани 3 відігравав роль стабілізуючого агента для ферменту.

Для створення мембран біосенсора, відповідно, 3 та 4, краплю суміші ГЕК-БСА (100 нл) наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача 1, а на іншу 2 - розчин БСА без ферменту (це був датчик порівняння). Для іммобілізації мембран датчики розміщували на повітрі за кімнатної температури на 20-30 хв. і потім відмивали від незв'язаних компонентів мембрани у буферному розчині протягом 10-15 хв.

Приклад аналізу вмісту АТФ в розчині. Спочатку отримували залежність відгуків біосенсора від різних концентрацій АТФ (при сталій концентрації глюкози) - одержували калібрувальний графік (фіг. 4). Для перевірки роботи пропонованого кондуктометричного біосенсора з реальними зразками, готували розчин з умовно невідомою концентрацією АТФ. Потім до вимірювальної комірки додавали аліквоту даного розчину. Оскільки АТФ є зарядженою речовиною, то спостерігається неселективний відгук біосенсора. Після стабілізації сигналу, до робочої комірки додавали аліквоту модельного розчину АТФ і визначали величину відгуку біосенсора. В залежності від цієї величини, по калібрувальному графіку отримували концентрацію АТФ, яка співпадала з умовно невідомою концентрацією АТФ у розчині.

З прикладу видно, що пропонований кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах є простішим та дешевшим за будовою (ціна запропонованого біосенсора зменшилася в 10 разів порівняно з відомим) і дозволив із меншим впливом глюкози та інших сторонніх речовин проводити аналіз концентрації АТФ в розчинах (похибка вимірювання при роботі із запропонованим біосенсором може зменшитись на 100 %, порівняно з роботою відомого прототипу).

Джерела інформації:

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия Человека: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ.: - М.:Мир, 1993.

2. Страйер Л. Биохимия: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ. - М.:Мир, 1985.

3. G. Burnstock. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends in Pharmacological Sciences, V. 27, 2006, P. 166-176.

4. B. G. Frenguelli, G. Wigmore, E. Llaudet, N. Dale. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus // Journal of Neurochemistry, V. 101, 2007, P.1400-1413.

5. McElroy, W.D. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, V. 33, 1947, P. 342-345.

6. H.U. Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis (3rd ed.) // Deerfield Beach, VCH Publishers, 1984, 340 pp.

7. Y. Kawamoto, K. Shinozuka, M. Kunitomo, J. Haginaka. Determination of ATP and Its Metabolites Released from Rat Caudal Artery by Isocratic Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography // Analytical Biochemistry, V. 262, 1998, P. 33-38.

8. S. V. Khlyntseva, Ya. R. Bazel', A. B. Vishnikin, V. Andrush. Methods for the Determination of Adenosine Triphosphate and Other Adenine Nucleotides // Journal of Analytical Chemistry, V. 64, 2009, P. 657-673.

9. M. Gotoh, E. Tamiya, I. Karube, Y. Kagawa. A microsensor for adenosine-5'-triphosphate pH-sensitive field effect transistors // Analytica Chimica Acta, V. 187, 1986, P. 287-291.

10. W. Wen, T. Bao, J. Yang, M.-Z. Zhang, W. Chen, H.-Y. Xiong, X.-H. Zhang, Y.-D. Zhao, S.-F. Wang. A novel amperometric adenosine triphosphate biosensor by immobilizing graphene/dual-labeled aptamers complex onto poly(o-phenylenediamine) modified electrode // Sensors and Actuators B: Chemical, V. 191, 2014, P. 695-702.

11. B. A. Patel, M. Rogers, T. Wieder, D. O'Hare, M.G. Boutelle. ATP microelectrode biosensor for stable long-term in vitro monitoring from gastrointestinal tissue // Biosensors and Bioelectronics, V. 26, 2011, P. 2890-2896.

12. Y. He, J. Tian, K. Hu, J. Zhang, S. Chen, Y. Jiang, Y. Zhao, S. Zhao. An ultrasensitive quantum dots fluorescent polarization immunoassay based on the antibody modified Au nanoparticles amplifying for the detection of adenosine triphosphate // *Analytica Chimica Acta*, V. 802, 2013, P. 67-73.

5 13. A.-M. Alam, M. Kamruzzaman, S. H. Lee, Y. H. Kim, H. J. Jo, S. H. Kim, S.-R. Park. Sensitive determination of adenosine disodium triphosphate in soil, milk, and pharmaceutical formulation by enoxacin-europium (III) fluorescence complex in solution // *Journal of Luminescence*, V. 132, 2012, P. 789-794.

10 14. Y. Miao, J. Liu, F. Hou, C. Jiang. Determination of adenosine disodium triphosphate (ATP) using norfloxacin-Tb³⁺ as a fluorescence probe by spectrofluorimetry // *Journal of Luminescence*, V. 116, 2006, P. 67-72.

15 15. O.O. Soldatkin, O.M. Schuvailo, S. Marinesco, R. Cespuaglio, A.P. Soldatkin. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection // *Talanta*, V.78, 2009, P.1023-1028.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20 Кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах, що складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази, чутлива до аденозин-5'-трифосфату, на другу нанесена референтна мембрана на основі сироваткового альбуміну бика, робочі області біосенсора знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину, виходи електродів під'єднані до кондуктометричної установки, яка в свою чергу під'єднана до персонального комп'ютера.

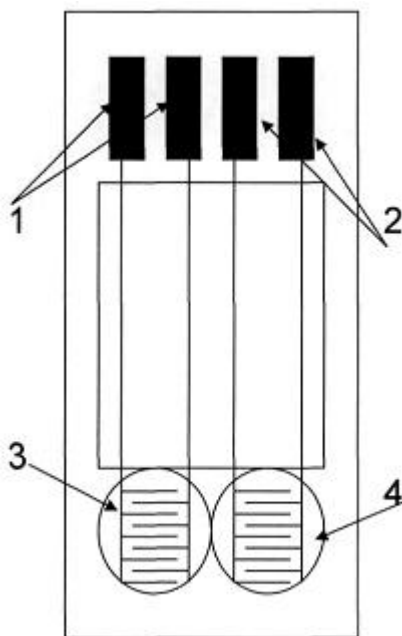
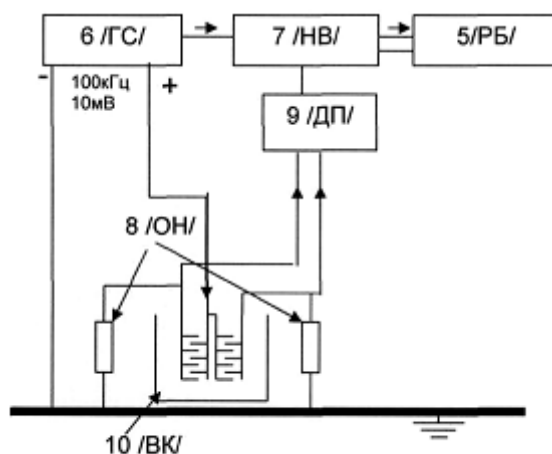
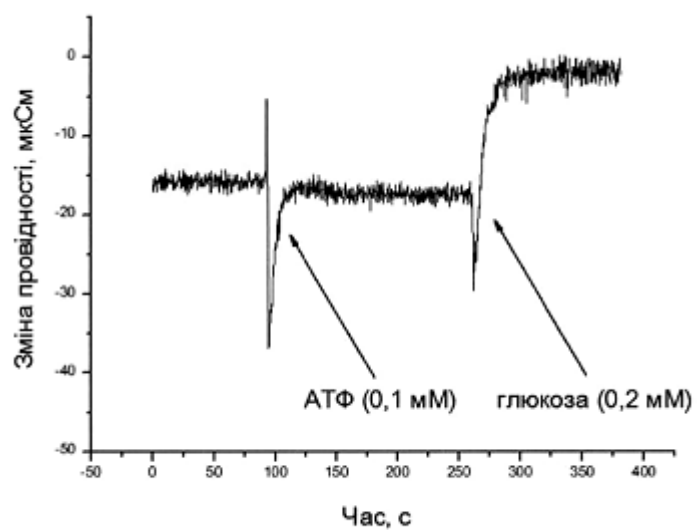


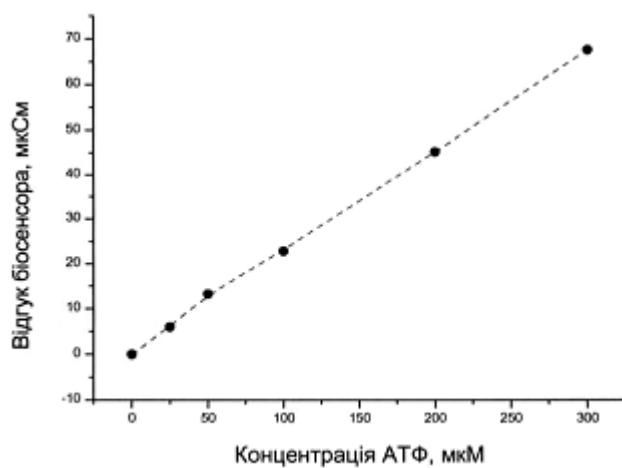
Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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