



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56857 (13) U
(51) МПК
G01N 27/414 (2011.01)
G01N 33/49 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ФЕРМЕНТНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ L-КАРНІТИНУ

1

2

(21) u201009474

(22) 28.07.2010

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.

(72) НАЗАРЕНКО ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА, МАРЧЕНКО СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА, АРХИПОВА ВАЛЕНТИНА МИКОЛАЇВНА, СОЛДАТКІН ОЛЕКСІЙ ПЕТРОВИЧ, ПАВЛЮЧЕНКО ОЛЕКСІЙ СЕРГІЙОВИЧ, КУКЛА ОЛЕКСАНДР ЛЕОНІДОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ФІЗИКИ НАПІВПРОВІДНИКІВ ІМ. В.Є. ЛАШКАРЬОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Ферментний біосенсор для визначення концентрації L-карнітину, який містить перетворювач на

основі двох ідентичних напівпровідникових рН-чутливих польових транзисторів, на один з яких нанесено робочу мембрану на основі ферменту бутирилхолінестераза, що є чутливою до L-карнітину, на другий нанесено референтну мембрану з сироватковим альбуміном бика, вказаний біосенсор розташований у вимірювальній кюветі для досліджуваного розчину, де встановлений також електрод порівняння, виходи обох рН-чутливих польових транзисторів призначені для підключення до відповідних входів приладу для вимірювання сигналів потенціометричних датчиків на основі іон-селективних польових транзисторів, а виходи цього приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера.

Корисна модель відноситься до галузі біомедичних досліджень і може бути використана, зокрема, для аналізу крові, а саме до конструкції аналітичного приладу - потенціометричного ферментного біосенсора на основі іон-селективного польового транзистора (ІСПТ) з рН-чутливим шаром для визначення L-карнітину, і може бути застосована для здійснення кількісного експрес-визначення L-карнітину та контролю етіології різних захворювань, пов'язаних з нестачею L-карнітину, а більш конкретно до ферментного біосенсору для визначення концентрацій L-карнітину у досліджуваних зразках.

Для медицини інтерес до застосування та контролю вмісту L-карнітину ((3R)-3-hydroxy-4-(trimethylammonio) butanoate) рідких середовищ організму пов'язаний з тим, що L-карнітин грає фундаментальну роль в транспорті жирних кислот у мітохондрії, де відбувається їх окиснення з утворенням АТФ, що сприяє, тим самим, утилізації жирів. L-карнітин проявляє ефект збереження у відношенні до білків за рахунок запобігання використанню амінокислот на енергетичні потреби. Дефіцит L-карнітину в організмі призводить до порушення ліпідного та білкового обміну. Крім цього, L-карнітин виявляє анаболічну, антигіпоксичну

та антигеріоїдну дії, стимулює регенерацію тканин та підвищує апетит. Також він приймає участь у процесах енергозабезпечення м'язової тканини та, що особливо важливо, серцевого м'яза. L-карнітин ефективний при серцевій недостатності, стенокардії, аритміях. Він є кофактором метаболічних процесів, що забезпечують підтримку активностей коензиму А та може викликати незначне пригнічення ЦНС. Але він також нормалізує діяльність центральної нервової системи, виявляє антидеприсантний ефект, покращує пам'ять. L-карнітин необхідний для функціонування репродуктивної системи чоловіків. Існує багато патологічних станів, причиною яких є нестача L-карнітину, тому визначення L-карнітину є необхідним для встановлення етіології процесу захворювання.

З усього вище наведеного можна зробити висновки, що існує нагальна потреба у наявності системи моніторингу концентрації L-карнітину, і перш за все, у крові.

Для вивчення поведінки L-карнітину у крові при різних захворюваннях та терапії необхідні прості, швидкі та точні, специфічні методи визначення. До існуючих на даний момент методів визначення L-карнітину перш за все відноситься радіоензиматичний метод [1, 2, 3] та HPLC [4, 5, 6].

(19) UA (11) 56857 (13) U

Цей метод широко використовується на практиці та досить простий, але потребує використання радіоактивних ізотопів, які є складними у використанні та потребують спеціальних робочих умов, а також існує ризик для здоров'я людей при їх застосуванні, що пов'язаний з радіацією. Хроматографічні методи дозволяють ідентифікувати та виділити деякі види ацил-карнітинів, але вони потребують використання коштовного та складного обладнання. Крім того, в останнє десятиріччя для визначення L-карнітину та його ефірів стає все більш популярною тандемна мас-спектрометрія завдяки високій чутливості та специфічності [7, 8]. Найбільш поширеним є метод, заснований на ферментативній реакції з використанням ферменту карнітинацилтрансферази (EC2.3.1.7). Але із-за високої вартості це устаткування неможливо використовувати у лабораторних умовах, тому поки що цей тип аналізу сфокусований тільки на дослідженні вроджених помилок метаболізму L-карнітину, ніж на його кількісному визначенні.

На даний момент відомий біосенсор, що вміщує п'єзоелектричний та амперометричний сенсорні елементи із застосуванням в якості біологічного елемента карнітин для вимірювання активності холінестераз (бутирил- та ацетилхолінестерази) та ступеню інгібування активності ферменту діізопропілфторосульфатом [9]. Але цей біосенсор використовує карнітин як чутливу молекулу, і за його допомогою неможливо визначати концентрації карнітину в зразках. Недоліком цього біосенсору також є складна процедура підготовчого процесу та застосування одразу двох різних за природою сенсорних перетворювачів, що ускладнює вимірювання та збільшує вірогідність похибки.

Авторами під час проведення патентно-інформаційних досліджень і підготовки заявки не виявлені конструкції ферментного біосенсору для визначення концентрації L-карнітину на основі іон-селективного польового транзистора (ІСПТ) з рН-чутливим шаром для визначення L-карнітину.

В основу запропованої корисної моделі покладено задачу створення ферментного біосенсору для визначення L-карнітину, який би дозволив отримати більш високу точність вимірювання концентрації L-карнітину у досліджуваних зразках.

Поставлена задача вирішується запропонованим ферментним біосенсором для визначення концентрації L-карнітину, який містить перетворювач на основі двох ідентичних напівпровідникових рН-чутливих польових транзисторів, на один з яких нанесено робочу мембрану на основі ферменту бутирилхолінестераза, що є чутливою до L-карнітину, на другий нанесено референтну мембрану з сироватковим альбуміном бика, вказаний біосенсор розташований у вимірювальній кюветі для досліджуваного розчину, де встановлений також електрод порівняння, виходи обох рН-чутливих польових транзисторів призначені для підключення до відповідних входів приладу для вимірювання сигналів потенціометричних датчиків на основі іон-селективних польових транзисторів, а виходи цього приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера.

Поставлена задача вирішується за рахунок використання в конструкції приладу диференційної пари напівпровідникових рН-чутливих перетворювачів на основі ІСПТ.

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється наступними графічними матеріалами:

Фіг.1. Схематичний вигляд напівпровідникового перетворювача на основі двох ідентичних рН-чутливих польових транзисторів.

Фіг.2. Конструкція вимірювальної кювети для ІСПТ-перетворювача.

Фіг.3. Блок-схема біосенсорної системи на основі рН-чутливих ІСПТ для визначення L-карнітину у досліджуваних зразках.

Фіг.4. Відгуки біосенсора на основі ІСПТ на додавання субстрату та L-карнітину.

Фіг.5. Калібрувальна крива визначення L-карнітину. Пропонований біосенсор для визначення концентрації L-карнітину (Б) складається з перетворювача (Фіг.1) на основі ІСПТ 1 та 2, на один з яких нанесено робочу мембрану 3 на основі ферменту бутирилхолінестерази, що є чутливою до L-карнітину, на другий нанесено референтну мембрану (4) з сироватковим альбуміном бика та контактних виводів 5; вимірювальної кювети (БК) з буферним розчином (Фіг.2), що містить металеву основу 6, на яку встановлюється монтажна плата 7 з перетворювачем на основі ІСПТ з нанесеними мембранами, фторопластової кришки 8 з силконовим ущільненням 9, пробоприймача 10 та електродом порівняння 11. Також система складається з потенціометричного приладу (ПП) 12 (Фіг.3), та персонального комп'ютера (ПК) 13.

Перетворювач на основі ІСПТ 1 та 2 з нанесеними ферментною - 3 та референтною - 4 мембранами змонтований на друкованій монтажній платі 7 та розташований у вимірювальній кюветі 6, за допомогою вихідних контактів 5 підключений до відповідних входів потенціометричного приладу 12, до якого також підключений електрод порівняння 11. Виходи приладу підключені до комп'ютера 13, який призначений для керування процесом вимірювання сигналів ІСПТ приладу та перерахунку отриманих даних у значення концентрації L-карнітину.

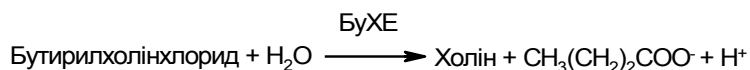
Необхідна чутливість визначення L-карнітину забезпечується застосуванням диференційного методу вимірювання та можливістю підключення до портативного потенціометричного приладу, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України [10], що працює по схемі прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. До входу приладу підключається двохелементний потенціометричний ферментний біосенсор, а також електрод порівняння. Вихід приладу підключається до комп'ютера через послідовний порт.

Застосування потенціометричного методу вимірювання з використанням пари диференційних рН-чутливих польових транзисторів та створення оптимальних умов для визначення L-карнітину за рахунок використання ферменту бутирилхолінестерази в складі біосенсора дозволило проводити

більш точну оцінку вмісту L-карнітину у досліджуваному зразку.

В основі роботи потенціометричного біосенсора для визначення концентрації L-карнітину ле-

жить ефект інгібування наступної ферментативної реакції:



Під час ферментативної реакції бутирилхолінестераза розщеплює бутирилхолін, при цьому збільшується концентрація протонів в робочій мембрані, відповідно, відбувається зміна рН, яку і можна реєструвати за допомогою рН-ІСПТ [11]. За допомогою ІСПТ з рН-чутливим шаром відбувається перетворення біохімічного сигналу в електричний, що дозволяє реєструвати відгуки біосенсора на додавання субстрату. Для аналізу концентрації L-карнітину необхідно додати досліджуваний зразок у кювету з ІСПТ, на який нанесено фермент, при цьому в ході контакту з L-карнітином відбувається інгібування ферменту. Оптимальне співвідношення компонентів у ферментній мембрані було отримано авторами експериментально за умов оцінки оптимальних аналітичних характеристик.

Пропонований біосенсор для визначення L-карнітину працює наступним чином.

Виготовлення ферментної та референтної мембран на поверхні перетворювачів проводили наступним чином: готували суміш для ферментної мембрани - 5 мг ферменту бутирилхолінооксидази (БуХЕ) та 5 мг сироваткового альбуміна бика (БСА) розчиняли у 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера, рН 7.4 з додаванням 10% гліцерину. Референтну мембрану готували додаванням до 10 мг БСА 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера, рН 7.4 з додаванням 10% гліцерину. Потім проводили іммобілізацію: ферментні (3) та референтні (4) мембрани формували на зигзагоподібних областях затворів ІСПТ (1, 2) крапельним методом. Біосенсор з нанесеними розчинами розташовували у ексикаторі з насиченими парами глутарового альдегіду (ГА) на 30 хвилин. Після інкубації в парах ГА мембрани ретельно висушували на повітрі протягом 15-20 хв. Потім мембрани відмивали від залишків ГА потрійною зміною 5 мМ буферного розчину (рН 7,4).

Вимірювання проводили за допомогою портативного вимірювального приладу, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України [10], що працює по схемі прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. Чутливість приладу становила близько 25 мкА/рН. До входу приладу підключали двохелементний потенціометричний ферментний біосенсор, а також електрод порівняння. Вихід приладу підключали до комп'ютера через послідовний COM або USB порт.

Пропоновану систему використовували таким чином.

Попередньо виготовляли та іммобілізували біоселективні та референтні мембрани.

Перед початком вимірювань з нанесеними мембранами біосенсор встановлювали у вимірювальній кюветі (Фіг.2) та додавали 1 мл 5 мМ буферного розчину, рН 7.4, витримували півгодини для отримання стабільного базового сигналу. Далі в кюветку додавали 1 мМ бутирил холін хлориду і отримували сигнал (Фіг.4), величину відгуку якого приймали за 100%. Потім додавали модельний розчин L-карнітину певної концентрації та отримували зменшення відгуку сенсора. Рівень інгібування визначали по співвідношенню відгуків біосенсора до та після інгібування. Після цього отримували залежність рівня інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази при додаванні в розчин різних концентрацій L-карнітину - одержували калібрувальний графік (Фіг.5), за допомогою якого визначали концентрацію L-карнітину в досліджуваних зразках.

Таким чином, отримана калібрувальна крива демонструє, що запропонований ферментний біосенсор для визначення L-карнітину є функціонально придатним і дозволяє одержувати більш точні результати із визначення L-карнітину у досліджуваних зразках у порівнянні з відомими пристроями.

Джерела інформації:

1. Ceberblad G., Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range // Clin.Chem. Acta. - 1972. V.37, P. 235-243.
2. McGarry J., Foster D. An improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine // J. Lipid Res. - 1976. V. 22, P. 1589-1592.
3. Borum P.R. Carnitine: determination of total carnitine using radioenzymatic assay // J. Nutr. Biochem.-1990. V.1. P. 111-114.
4. McEntire C.J., Lever M., Storer M.K. A high performance liquid chromatographic method for the measurement of total carnitine in human plasma and urine // Clin. Chim. Acta. - 2004, V.344, P. 123-130.
5. Minkler P.E., Hopper C.L. Determination of free carnitine and total carnitine in human urine: derivation with 4'-bromophenacyl trifluoromethanesulfonate and high // Clin Chim. Acta. - 1992, V.212. P. 55-64.
6. Minkler P.E., Hopper C.L. Quantification of free carnitine, individual short - and medium-chain acylcarnitines, and total carnitine in plasma by high-performance liquid chromatography // Anal. Biochem. - 1993. - V. 212, P. 510-518.
7. Ho C.S., Cheng B.S., Lam C.W. Rapid liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the serum free and total carnitine // Clin Chem. - 2003, V. 49, P. 1189-1191.
8. Osorio J.H., Pourfarzam M. Plasma free and total carnitine measured in children by tandem mass

spectrometry // Br.J. Med. Biol. Res. - 2002, V. 35, P. 1171-1265.

9. Zeravik J., Teller C, Scheller F.W. Analysis of cholinesterase binding to a carnitine-modified EQCM sensor // Biosensors and Bioelectronics. - 2007. V. 22, P. 2244-2249.

10. Кукла О.Л., Павлюченко О.С., Бушма О.В., Голтвянський Ю.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Патент України на корисну модель "Аналого-

цифровий іонно-сенсорний вимірювач параметрів рідких середовищ", UA №48359 МПК G01N 27/26, 27/27, заявл. 26.10.2009, опубл. 10.03.2010, Бюл. №5.

11. S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors // Analytica Chimica Acta. - 2006, 568. - P.248-258.

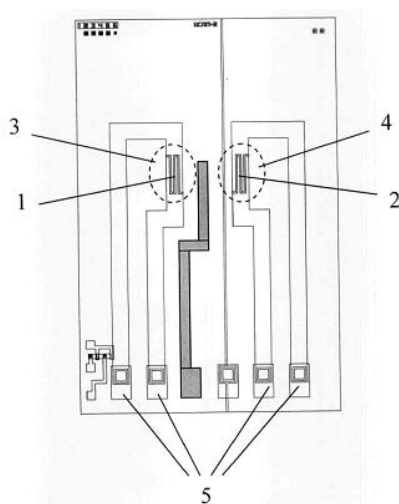


Fig. 1

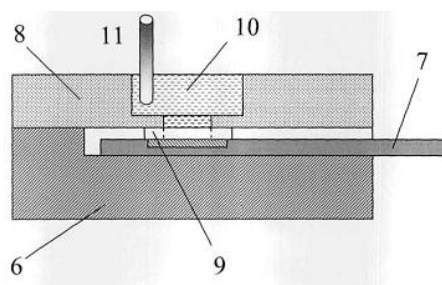


Fig. 2

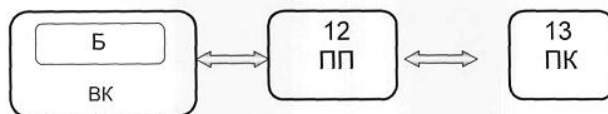


Fig. 3

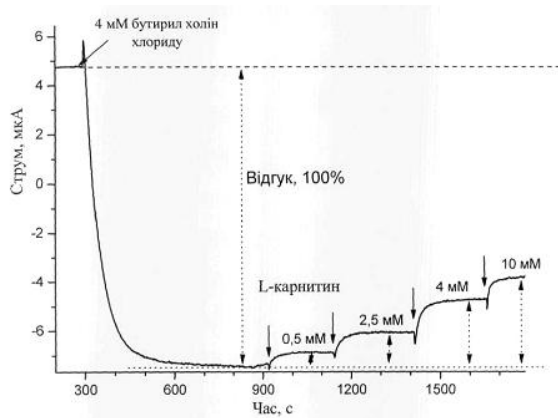


Fig. 4

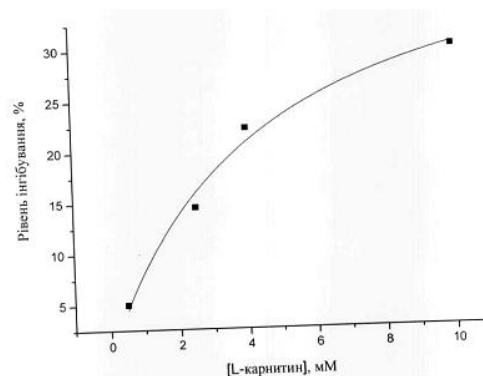


Fig. 5