



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 103744

(13) U

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2015 06792	(72) Винахідник(и):	Кучеренко Іван Сергійович (UA), Кучеренко Дар'я Юріївна (UA), Солдаткін Олександр Олексійович (UA), Дзядзевич Сергій Вікторович (UA), Солдаткін Олексій Петрович (UA), Буржу Аката Курч (TR)
(22) Дата подання заявки:	09.07.2015	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.12.2015	(74) Представник:	Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2015, Бюл.№ 24		

(54) КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ

(57) Реферат:

Кондуктометричний біосенсор для визначення аденозин-5'-трифосфату складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази, 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.

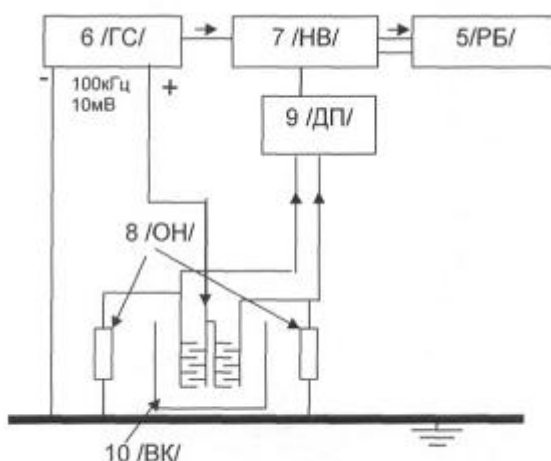


Fig. 2

UA 103744 U

Пропонована корисна модель належить до галузі біотехнології та молекулярної біології і може бути використана, зокрема, для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату (АТФ) в біотехнологічних зразках та наукових препаратах, а більш конкретно, до кондуктометричного біосенсора для визначення аденозин-5'-трифосфату.

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 [1, 2]. Крім того, визначення концентрації АТФ може бути ефективно використане при розробці ліків, зокрема таких, що базуються на інгібіторах кіназ.

На сьогодні існує ряд лабораторних біосенсорів для визначення АТФ. В їх основі лежать pH-чутливі польові транзистори [3], амперометричні скловуглецеві електроди [4], амперометричні платинові мікроелектроди [5]. Відомі біосенсиори на основі фотодетекції зв'язування АТФ з різними рецепторними молекулами [6, 7, 8]. Недоліками ряду створених біосенсорів є складна будова електрода [3, 4], що обумовлює високу собівартість виготовлення таких біосенсорів. Методика вимірювання концентрації АТФ афінними біосенсорами не дозволяє проводити вимірювання концентрації АТФ у реальному часі [4, 6, 8]. 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 [6, 7, 8].

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 [9]. Однак, описаний пристрій є складний за будовою і менш селективним.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого кондуктометричного біосенсора для визначення аденозин-5'-трифосфату, 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 для визначення аденозин-5'-трифосфату, що складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази, на другу нанесена референтна мембрана на основі сироваткового альбуміну бика, робочі області біосенсору 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 для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату лежить ферментативна реакція фосфорилування глюкози, що протікає в ферментативній мембрані, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем:



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 запропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де на фіг. 1 схематично показано кондуктометричний біосенсор для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату;

на фіг. 2 показана блок-схема кондуктометричної установки;

на фіг. 3 продемонстровано принцип роботи кондуктометричного біосенсора для визначення аденозин-5'-трифосфату на реальному прикладі проведення експерименту;

а на фіг. 4 наведено калібрувальний графік залежності відгуку біосенсора від концентрації аденозин-5'-трифосфату.

Кондуктометричний біосенсор для визначення аденозин-5'-трифосфату 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 на основі БСА 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 блоку 5 /РБ/, призначеного для реєстрації сигналів з біосенсора. Окрім того, установка забезпечена опорами навантаження 8 /ОН/, призначеними для отримання 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 прямого ферментного аналізу для визначення аденозин-5'-трифосфату (АТФ) 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 ($R_h=1$ 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 блоку 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 запропонований кондуктометричний біосенсор для визначення аденозин-5'-трифосфату є простішим та дешевшим за будовою (ціна запропонованого біосенсора зменшилася в 10 разів порівняно з відомим) та він 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 відомих біосенсорів).

Джерела інформації:

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

2. 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.

3. 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

4. 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.

5. 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.

6. 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.

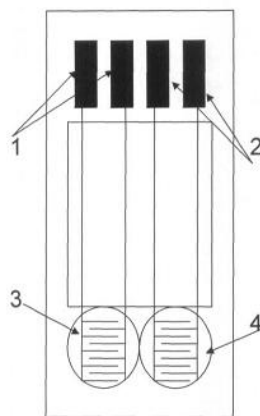
7. A.-M. Alam, M. Kamruzzaman, S.H. Lee, Y.H. Kim, H.J. Jo, S.H. Kim, S.-R. Park. Sensitive determination of adenosine disodium triphosphate in soil, milk, and pharmaceutical formulation by enoxacin-europium (III) fluorescence complex in solution // Journal of Luminescence, V. 132, 2012, P. 789-794.

8. 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.

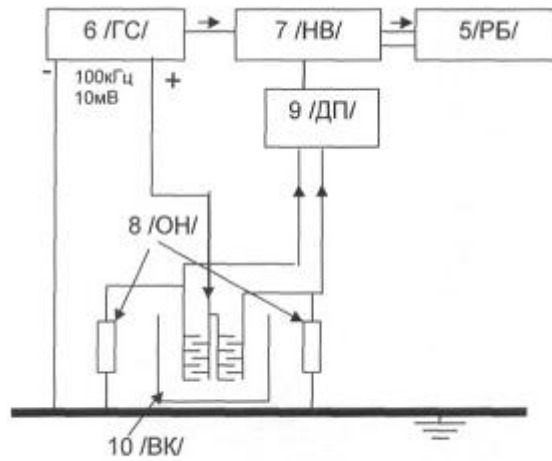
9. O.O. Soldatkin, O.M. Schuvailo, S. Marinesco, R. Cespuglio, A.P. Soldatkin. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection // Talanta, V. 78, 2009, P. 1023-1028.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

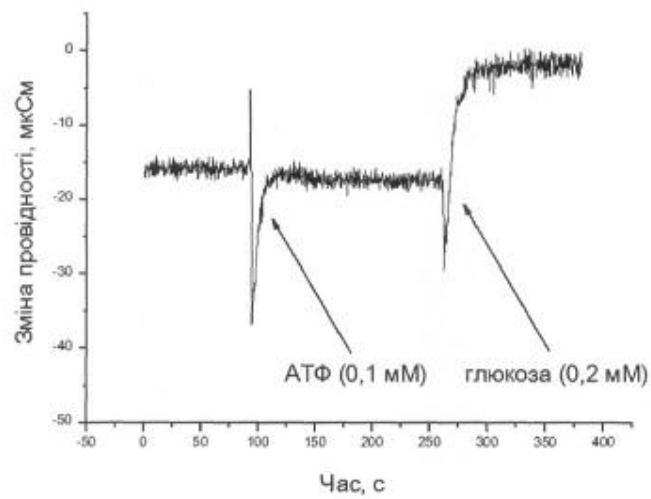
Кондуктометричний біосенсор для визначення аденозин-5'-трифосфату, що складається з двох пар кондуктометричних електродів, на одну з яких нанесена одноферментна мембрана на основі гексокінази, на другу нанесена референтна мембрана на основі сироваткового альбуміну бика, робочі області біосенсора знаходяться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



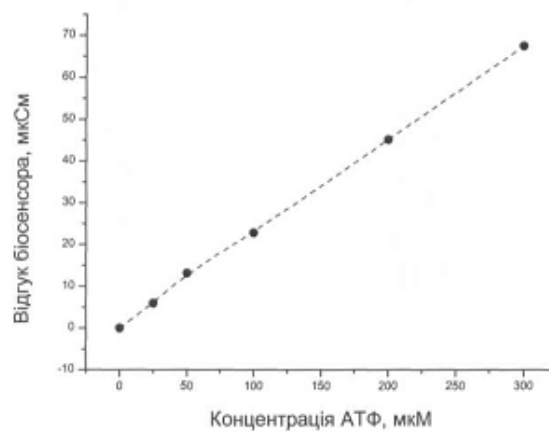
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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