



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 78106

(13) U

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09936**

(22) Дата подання заявки: **17.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.03.2013**

(46) Публікація відомостей **11.03.2013, Бюл.№ 5**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Кучеренко Іван Сергійович (UA),
Солдаткін Олександр Олексійович (UA),
Солдаткін Олексій Петрович (UA),
Сльська Ганна Валентинівна (UA)**

(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

(54) ПОРТАТИВНА АМПЕРОМЕТРИЧНА БІОСЕНСОРНА СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ ТА ГЛЮКОЗИ У РОЗЧИНІ

(57) Реферат:

Портативна амперометрична біосенсорна система для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині містить два амперометричних біосенсиори, кожен з яких містить платиновий дисковий електрод та нанесену на електрод ферментну мембрану. Один із амперометричних біосенсиорів містить ферментну мембрану на основі глюкозооксидази, чутливу до глюкози, а другий амперометричний біосенсор містить ферментну мембрану, що складається з ферментної системи глюкозооксидаза-гексокіназа та призначена для визначення аденозин-5'-трифосфату. Робочі області обох біосенсиорів знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину, в яку встановлені також допоміжний платиновий електрод та електрод порівняння. Виходи електродів і біосенсиорів з'єднані з мультиплексором, який, в свою чергу, з'єднаний з потенціостатом, виходи якого підключені до відповідних входів комп'ютера.

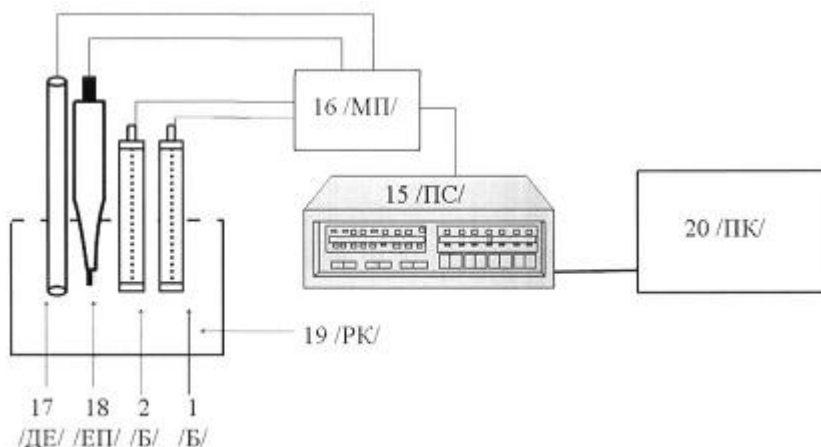


Fig. 2

UA 78106 U

Корисна модель належить до біотехнології та молекулярної біології і може бути використана, зокрема, для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфат (АТФ) та глюкози в біотехнологічних зразках та наукових препаратах, а більш конкретно до портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині.

АТФ є ключовою макроергічною молекулою в клітинах будь-якого організму. Він синтезується шляхом фосфорилювання аденозин-5'-дифосфату в таких ключових для клітини біохімічних шляхах, як гліколіз та окисне фосфорилювання; крім цього, АТФ утворюється як побічний продукт в багатьох окремих ферментативних реакціях. В нормальних умовах головним джерелом енергії, зокрема АТФ, в клітині та організмі є реакції розпаду вуглеводів, передусім глюкози; в умовах голодування АТФ утворюється під час розпаду жирних кислот або амінокислот. Синтезовані молекули АТФ використовуються під час синтезу практично всіх необхідних клітині сполук, таких як жирні кислоти, білки, нуклеотиди, нуклеїнові кислоти. 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]. На рівні організму, АТФ бере участь в регуляції м'язового скорочення та агрегації тромбоцитів [3], підтримці тонуусу судин, передачі нервового імпульсу і регуляції діяльності нервової системи [4, 5] та в багатьох інших процесах.

У зв'язку з усім вищесказаним, зрозуміло, що моніторинг концентрації АТФ, перш за все в біохімічних, молекулярно-біологічних та біотехнологічних зразках є дуже важливим. Крім того, визначення концентрації АТФ може бути ефективно використане в харчовій промисловості для виявлення грибового забруднення та при розробці ліків, зокрема таких, що базуються на інгібіторах гексокінази [6]. Сучасні стандартні методи високоточного визначення АТФ потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання, яке необхідне для спектрофотометрії та рідинної хроматографії [7, 8]. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність в досить складній попередній підготовці проб для аналізу. Флуоресцентні, біо- та хемілюмінесцентні методи позбавлені частини наведених недоліків, проте також часто не відповідають потребам моніторингу АТФ [9, 10, 11]. 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 прототипів біосенсорів для визначення АТФ, в основі яких лежать різні ферментативні реакції [12-18]. Зокрема, для створення біосенсорів, чутливих до АТФ, було запропоновано ферменти H^+ -АТФазу [12] та апіразу (АТФ-дифосфогідролазу) [13]. Крім цього, було використано ферментні системи: гліцеролкіназа-гліцерол-3-фосфат оксидаза [14] та глюкозооксидаза-гексокіназа [6, 15, 16, 17, 18].

Недоліками ряду створених біосенсорів є відносно низька чутливість до АТФ та залежність роботи біосенсорів від іонної сили [12, 13], що унеможливило використання цих біосенсорів для аналізу біологічних рідин з їх високою іонною силою та мікромолярним вмістом АТФ. Головним недоліком біосенсора, описаного в роботі [14] є низька селективність. Для інших біосенсорів [15-18] селективність та вплив інтерферуючих речовин взагалі не були досліджені. Крім того, майже всі біосенсиори для визначення АТФ є моносенсорами, які, крім АТФ, чутливі одночасно до гліцеролу чи глюкози (залежно від використаної ферментної системи). Більше того, методика вимірювання АТФ, яка використовується в створених біосенсорах, вимагає відносно високої та сталої концентрації субстратів ферментної системи (гліцеролу чи глюкози) в розчині. Тому зміна концентрації одного з субстратів (гліцеролу або глюкози) автоматично призведе до значної похибки в роботі біосенсора, оскільки ця зміна концентрації не зможе бути зареєстрована моносенсором під час визначення кількості другого субстрату (АТФ). З цієї причини перспективним напрямом є створення біосенсорних систем, які здатні одночасно визначати концентрацію низки речовин за допомогою декількох незалежних біосенсорів.

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 [6]. Однак, описаний пристрій менш селективний та непридатний для аналізу зразків, що містять глюкозу.

Під час патентно-інформаційних досліджень автори не виявили відомих портативних амперометричних біосенсорних систем для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині.

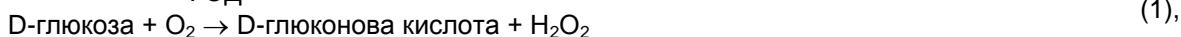
В основу запропонованої корисної моделі поставлена задача створення такої портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату

та глюкози у розчині, яка б дозволила більш селективно та більш точно визначати АТФ та глюкозу.

Поставлена задача вирішується запропонованою портативною амперометричною біосенсорною системою для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині, що складається з двох амперометричних біосенсорів, кожен з яких містить платиновий дисковий електрод та нанесену на електрод ферментну мембрану, один із амперометричних біосенсорів містить ферментну мембрану на основі глюкозооксидази, чутливу до глюкози, а другий амперометричний біосенсор містить ферментну мембрану, що складається з ферментної системи глюкозооксидаза-гексокіназа та призначена для визначення аденозин-5'-трифосфату, робочі області обох біосенсорів знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину, в яку встановлені також допоміжний платиновий електрод та електрод порівняння, виходи електродів і біосенсорів з'єднані з мультиплексором, який, в свою чергу, з'єднаний з потенціостатом, виходи якого підключені до відповідних входів комп'ютера.

В основі роботи амперометричної біосенсорної системи для визначення АТФ і глюкози лежать дві ферментативні реакції, що одночасно протікають в ферментативній мембрані, а також реакція розкладу перекису водню, яка безпосередньо і реєструється амперометричним перетворювачем:

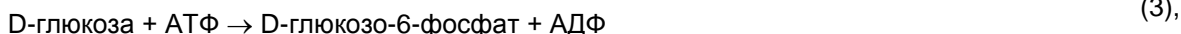
ГОД



+600 мВ



ГЕК



де ГОД - глюкозооксидаза, ГЕК - гексокіназа.

За наявності в розчині глюкози і відсутності АТФ, в ферментативній мембрані обох біосенсорів активна лише глюкозооксидаза, тому відбуваються реакції (1) та (2), і відгук обох біосенсорів пропорційний концентрації глюкози. Після додавання до робочого розчину АТФ, в мембрані другого біосенсора (яка містить глюкозооксидазу та гексокіназу) починається реакція (3), яка зменшує локальну концентрацію глюкози і, як наслідок, відгук цього біосенсора зменшується пропорційно концентрації АТФ. При цьому, відгук першого біосенсора лишається незмінним (через відсутність в його ферментній мембрані гексокінази), і тому цей біосенсор виступає свого роду контролем, що зменшує похибку вимірювань і підвищує селективність всієї біосенсорної системи до АТФ.

Суть корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

на фіг. 1 показано схематичний вигляд біосенсорів для визначення глюкози та АТФ;

на фіг. 2 показано блок-схему портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині;

на фіг. 3 показано відгуки біосенсорної системи на додавання субстратів;

на фіг. 4 наведено графік залежності величини відгуку портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині від концентрації глюкози.

на фіг. 5 наведено графік залежності величини відгуку портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині від концентрації АТФ.

Портативна амперометрична біосенсорна система для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині містить два амперометричні біосенсиори 1 /Б/ і 2 /Б/ (фіг. 1), кожен з яких складається з робочої області 3 /РО/ і 4 /РО/, платинового дроту 5 /ПД/ і 6 /ПД/, внутрішнього провідника 7 /ВП/ і 8 /ВП/, електричного з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда 9 /ЕЗ/ і 10 /ЕЗ/, епоксидної смоли 11 /ЕС/ і 12 /ЕС/ та контактної площадки 13 /КП/ і 14 /КП/, при цьому у першому амперометричному біосенсорі на робочу область 3 /РО/ нанесена ферментна мембрана на основі глюкозооксидази, а у другому амперометричному біосенсорі на робочу область 4 /РО/ нанесена ферментна мембрана, що складається з ферментної системи глюкозооксидаза-гексокіназа. Обидва біосенсиори входять до портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині (див. фіг. 2), що складається з потенціостату 15 /ПС/, мультиплексора 16 /МП/, до якого підключені два амперометричні біосенсиори 1 /Б/ і 2 /Б/, допоміжний платиновий електрод 17

/ДЕ/ та електрод порівняння 18 /ЕП/, робочої комірки для досліджуваного розчину 19 /РК/ та реєструючого пристрою (комп'ютер) 20 /ПК/.

Пропонована портативна амперометрична біосенсорна система для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині працювала так.

5 Попередньо виготовляли біоселективні мембрани. Для створення гелю для ферментної мембрани глюкозного біосенсора готували розчин з вмістом 4 % глюкозооксидази (ГОД), 4 % сироваткового альбуміну бика (БСА), 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Гель для ферментної мембрани другого біосенсора (чутливого до АТФ) робили таким же чином, але з додаванням ще 4 % гексокінази (ГЕК). До складу гелів додавався гліцерин для стабілізації ферментів при іммобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. В свою чергу, сироватковий альбумін бика в складі ферментних мембран відігравав роль стабілізуючого агента для ферментів. Перед нанесенням на поверхню електродів приготовлені гелі змішували з 0,4 % водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1.

15 Таким чином, ферментна мембрана, нанесена на робочу область першого амперометричного біосенсора складалась з 100 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, та з наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

ГОД	2-2,5
БСА	2-2,5
гліцерин	4-6
глутаровий альдегід (ГА)	0,2

Ферментна мембрана, нанесена на робочу область другого амперометричного біосенсора складалась з 100 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, та з наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

ГЕК	2-2,5
ГОД	2-2,5
БСА	2-2,5
гліцерин	4-6
ГА	0,2

Співвідношення компонентів біоселективних мембран було отримано експериментально. Його підібрали для покращення аналітичних характеристик біосенсора, таких як селективність, чутливість, операційна стабільність.

Після нанесення мембран на поверхню електродів обидва біосенсиори висушували 1 годину на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи для видалення надлишку глутарового альдегіду біосенсиори відмивали у буфері, в якому і проводились подальші досліді.

Обидва біосенсиори /Б/, а також допоміжний електрод /ДЕ/ та електрод порівняння /ЕП/ підключали до 8-канального мультіплексора 16 /МП/, який був під'єднаний до потенціостату 15 /ПС/, що працював у режимі амперометричних вимірювань. Електроди поміщали до робочої комірки 19 /РК/ об'ємом 3,0 мл, заповненої 25 мМ HEPES буфером, рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} , та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали певну аліквоту модельних розчинів глюкози і АТФ та отримували амперометричний сигнал з робочих електродів. Сигнал від біосенсорів автоматично оброблявся комп'ютером і виводився у графічному вигляді. Графічне зображення відгуків амперометричної біосенсорної системи на додавання глюкози та АТФ наведено на фіг. 3.

Приклад аналізу вмісту глюкози та АТФ в розчині.

Спочатку отримували залежності величин відгуків першого біосенсора (чутливого до глюкози) та другого біосенсора (чутливого до глюкози та АТФ) від різних концентрацій глюкози - одержували калібрувальні графіки для визначення глюкози (фіг. 4). Визначення АТФ проводили в два етапи: спочатку одержували відгук другого біосенсора на глюкозу, після чого додавали різну кількість модельного розчину АТФ і спостерігали зменшення відгуку біосенсора, обумовлене зменшенням приелектродного вмісту глюкози через роботу ферменту гексокінази. Шляхом додавання різної кількості модельних розчинів АТФ було побудовано калібрувальну криву для визначення концентрації АТФ, наведену на фіг. 5.

Для визначення умовно невідомої концентрації АТФ в досліджуваному розчині, додавали аліквоту досліджуваного розчину та отримували відгук обох біосенсорів. Відгук першого біосенсора (який містив глюкозооксидазу) збільшувався пропорційно вмісту глюкози, і за калібрувальною кривою визначали цю концентрацію глюкози. Відгук другого біосенсора (який містив глюкозооксидазу та гексокіназу) залежав як від концентрації глюкози, так і від концентрації АТФ у досліджуваному розчині, і був дещо нижчим за відгук першого біосенсора через конкуренцію між двома ферментами за глюкозу. Із різниці між відгуком першого та другого

біосенсора вираховували концентрацію АТФ, яка співпадала з умовно невідомою концентрацією АТФ у розчині.

Порівняно з амперометричним біосенсором [6], використання в роботі портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині покращило селективність аналізу АТФ шляхом усунення інтерферентного впливу глюкози, що може бути присутня в зразку, та покращило чутливість аналізу за рахунок визначення концентрації глюкози в цьому зразку.

Наприклад, у випадку вимірювання АТФ амперометричним біосенсором [6] реального зразку, що містить глюкозу кількістю 10 мкМ та АТФ кількістю 25 мкМ, похибка вимірювання АТФ становила 20-30 %, а якщо концентрація глюкози була більшою, то відповідно збільшувалася і похибка вимірювання. Похибка портативної амперометричної біосенсорної системи для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині становила до 5 %, не залежно від концентрації глюкози у досліджуваному зразку.

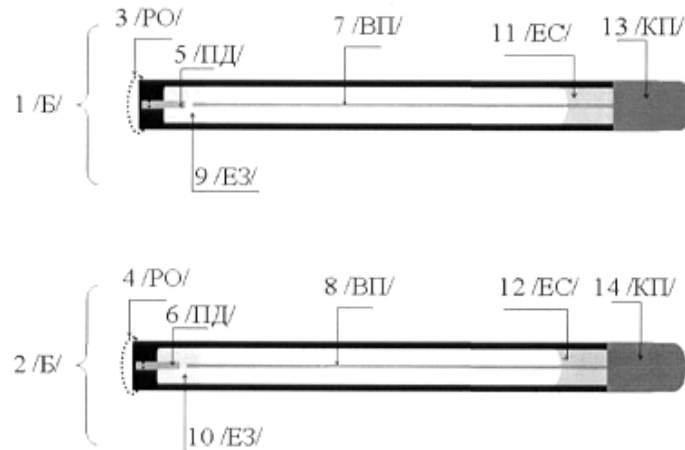
Джерела інформації:

1. Березов Т.Т. Коровкин Б.Ф. Биологическая химия (3-е изд.) // М.: Медицина, 1998.-704 с.
2. Ленинджер А. Основы биохимии (в 3-х т.) // М.: Мир, 1985.
3. A.V. Gourine, E. Llaudet, N. Dale, K.M. Spyer. Release of ATP in the Ventral Medulla during Hypoxia in Rats: Role in Hypoxic Ventilatory Response // The Journal of Neuroscience, V. 25, 2005, P. 1211-1218.
4. G. Burnstock. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends in Pharmacological Sciences, V. 27, 2006, P. 166-176.
5. B.G. Frenguelli, G. Wiggmore, 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.
6. 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.
7. H.U. Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis (3rd ed.) // Deerfield Beach, VCH Publishers, 1984, 340 pp.
8. 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.
9. G.P. Foy, G.E. Pacey. Determination of ATP using chelation-enhanced fluorescence // Talanta, V. 43, 1996, P. 225-232.
10. T. Pérez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomás, J. Martín. Determination of ATP via the photochemical generation of hydrogen peroxide using flow injection luminol chemiluminescence detection // Analytical and Bioanalytical Chemistry. V. 377. 2003, P. 189-194.
11. J.N. Miller, M.B. Nawawi, C. Burgess. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection // Analytica Chimica Acta, V. 266, 1992, P. 339-343.
12. 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.
13. S. Migita, K. Ozasa, T. Tanaka, T. Haruyama. Enzyme-based Field-Effect Transistor for Adenosine Triphosphate (ATP) Sensing // Analytical Sciences, 2007, 23 (1), P. 45.
14. E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou, N. Dale. Microelectrode Biosensor for Real-Time Measurement of ATP in Biological Tissue // Analytical Chemistry, V. 77, 2005, P. 3267-3273.
15. F. Scheller, D. Pfeiffer. Glucose oxidase-hexokinase bienzyme electrode sensor for adenosine triphosphate // Analytica Chimica Acta, V. 117, 1980, P. 383-386.
16. D. Compagnone, G.G. Guilbault. Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP // Analytica Chimica Acta, V. 340, 1997, P. 109-113.
17. A. Kueng, C. Kranz, B. Mizaikoff. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes // Biosensors and Bioelectronics, V. 19, 2004, P. 1301-1307.
18. S. Liu, Y. Sun. Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections // Biosensors and Bioelectronics, V. 22, 2007, P. 905-911.

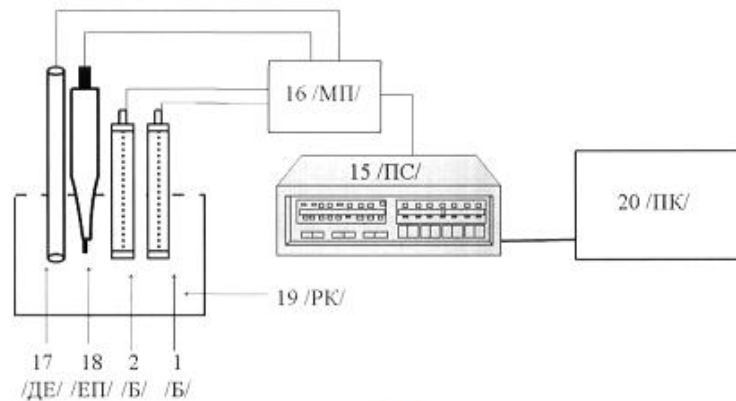
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Портативна амперометрична біосенсорна система для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині, що містить два амперометричних біосенсиори, кожен з яких містить платиновий дисковий електрод та нанесену на електрод ферментну мембрану, один із амперометричних біосенсорів містить ферментну мембрану на основі глюкозооксидази, чутливу

- до глюкози, а другий амперометричний біосенсор містить ферментну мембрану, що складається з ферментної системи глюкозооксидаза-гексокіназа та призначена для визначення аденозин-5'-трифосфату, робочі області обох біосенсорів знаходяться у робочій комірці для досліджуваного розчину, в яку встановлені також допоміжний платиновий електрод та електрод порівняння, виходи електродів і біосенсорів з'єднані з мультиплексором, який, в свою чергу, з'єднаний з потенціостатом, виходи якого підключені до відповідних входів комп'ютера.



Фиг. 1



Фиг. 2

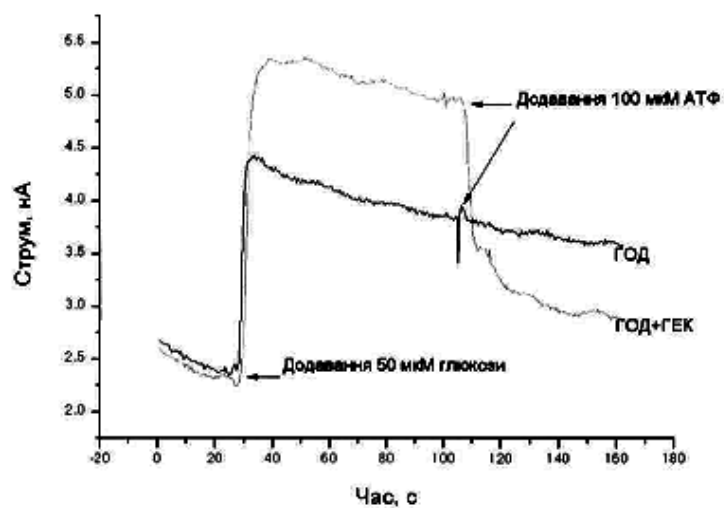


Fig. 3

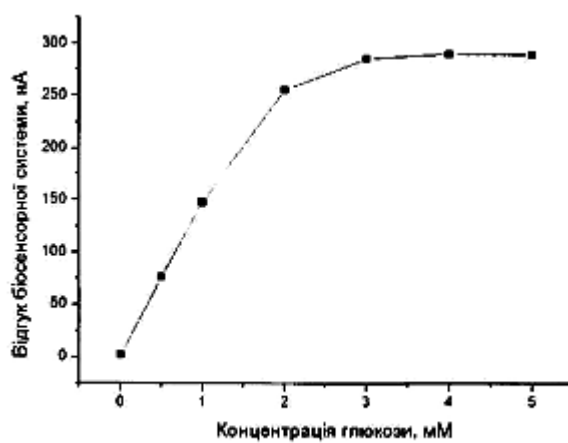


Fig. 4

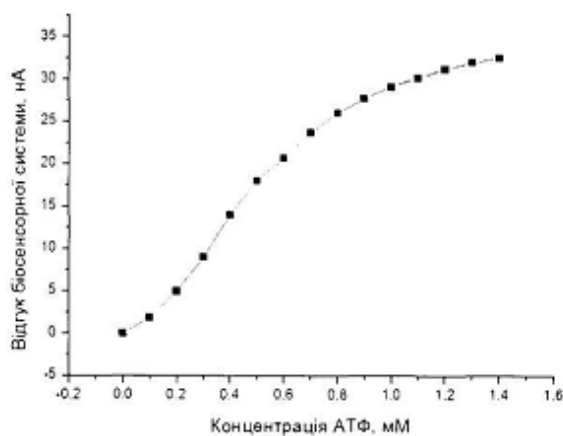


Fig. 5

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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