

УДК 577.27:576.8.077:543.426

Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена

Г. В. Преснова, М. Ю. Рубцова, А. М. Егоров

ГАЛИНА ВАСИЛЬЕВНА ПРЕСНОВА — кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: энзимология, био- и иммуносенсоры с пероксидазой хрена в качестве метки.

МАЙЯ ЮРЬЕВНА РУБЦОВА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: энзимология, аналитическая биотехнология, методы иммунохимического анализа и ДНК-анализа с пероксидазой хрена в качестве метки.

АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ ЕГОРОВ — академик РАН, доктор биологических наук, главный научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: физико-химическая биология, энзимология, биотехнология.

119991 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, тел. (495)939-27-27, факс (495)939-27-42, E-mail myr@enz.chem.msu.ru

Введение

Биосенсоры находят все более широкое применение в целом ряде отраслей науки, промышленности, сельского хозяйства, медицины и здравоохранения, так как позволяют быстро и качественно анализировать сложные, многокомпонентные смеси веществ.

Биосенсоры состоят из двух компонентов: системы биохимического распознавания и преобразователя первичного сигнала (трансдюсера). Как правило, в качестве биораспознающего реагента используют ферменты и другие специфические биологические объекты — антитела или антигены, отдельные клетки, микроорганизмы, срезы тканей — в иммобилизованном состоянии. Элемент биологического распознавания должен находиться в прямом контакте с преобразователем [1].

Уникальной особенностью биосенсоров, в отличие от химических датчиков, является высокая специфичность биораспознающего элемента, а также его способность осуществлять узнавание без дополнительных затрат энергии (повышения температуры, наложения потенциала и т.д.). Высокая специфичность позволяет количественно определять индивидуальное вещество либо группу родственных веществ в смеси [2].

Для преобразования первичного сигнала в биосенсорах наиболее часто используются электрохимические методы. Электрохимические биосенсоры представляют собой хорошую альтернативу традиционным аналитическим системам благодаря высокой селективности и простоте регистрирующих устройств. Электрохимические методы детекции отклика имеют ряд преимуществ перед другими методами, в частности, по сравнению со спектрофотометрией, а именно: быстрое получение

выходного сигнала, возможность анализа окрашенных и суспендированных образцов, возможность многократного использования биокатализатора. Все эти качества в сочетании с относительно простым аппаратным оформлением электрохимических биосенсоров вызывают повышенный к ним интерес — развиваются работы по их усовершенствованию и созданию устройств для практического применения.

Теоретические аспекты функционирования электрохимических биосенсоров

Электрохимическая детекция в прямых (безмедиаторных) биосенсорах основана на прямом каталитическом переносе электронов между поверхностью чувствительного элемента сенсора — электрода — и активным центром биораспознающего реагента. Перенос электронов может происходить непосредственно на поверхности электрода либо на предварительно модифицированной его поверхности, обеспечивающей прямой перенос электрона.

Существует структурная концепция для объяснения процесса переноса электрона между активным центром биокон компонента и электродом. На основе данных теоретических расчетов туннельного переноса электронов авторы статьи [3] получили эмпирическое уравнение, выражающее зависимость между скоростью внешне-сферного переноса электрона и глубиной залегания активного центра биораспознающего компонента. Критическое расстояние туннельного переноса было оценено в 1,24 нм при скорости переноса 10^2 с^{-1} . Другие исследователи приводят значения критических расстояний в интервале 1,2—1,6 нм [4]. На основании анализа экс-

периментальных данных, представленных в работе [5], сделан вывод, что те белки, которые являются активными в процессе прямого биоэлектрокатализа, обладают близко расположенным к поверхности белковой глобулы (менее 1 нм) активным центром. Отметим, что несмотря на несколько удачных разработок, к настоящему времени существует лишь небольшое число биосенсоров, функционирующих с прямым электронным переносом.

Для улучшения условий обмена электронами между активным центром фермента и электродом в сенсорную систему можно вводить специальное диффузионно-подвижное низкомолекулярное вещество, которое служит переносчиком электронов. В этом случае происходит так называемый медиаторный перенос электронов.

К медиаторам, обеспечивающим работу биосенсоров, предъявляются следующие основные требования [6]:

- 1) медиатор должен быстро реагировать с восстановленной формой биораспознающего фермента;
- 2) гетерогенные реакции с участием медиатора должны быть обратимы;
- 3) перенапряжение процесса регенерации окисленного медиатора должно быть низким и не зависеть от pH;
- 4) медиатор должен быть устойчивым как в окисленной, так и в восстановленной форме;
- 5) восстановленный медиатор не должен реагировать с кислородом;
- 6) медиатор должен быть нетоксичным.

Выбор медиатора с учетом указанных требований осуществляется, исходя из окислительно-восстановительных свойств активного центра биохимического реагента.

Одна из важнейших проблем, с которой столкнулись разработчики биосенсоров, касалась процедуры иммобилизации медиатора на электроде, которая, как предусматривалось, должна обеспечить прочное удерживание медиатора на поверхности электрода, чтобы предотвратить вымывание его в раствор. Поиски подходов к решению этой проблемы привели к созданию концепции безреагентных амперометрических биосенсоров. В рамках этой концепции биосенсоры — это система на основе амперометрических ферментных электродов, которые генерируют сигнал, пропорциональный концентрации субстрата и независимый от содержания медиатора или кофермента [7]. При этом имеется в виду, что присутствие медиатора и кофермента вблизи электрода не исключается. Таким образом, при разработке безреагентных амперометрических биосенсоров медиаторного типа возникает потребность в методах иммобилизации медиаторов, ферментов и коферментов, при которых не затрудняется их функционирование как эффективных переносчиков электронов между биокомпонентом и электродом, а также сохраняется высокая скорость электронного переноса.

Из биосенсоров наибольшее развитие и применение получили системы на основе ферментов в качестве биораспознающего компонента. При адсорбции ферментов на твердых поверхностях (металлы, керамика, полиме-

ры) они частично или полностью сохраняют свою структуру и каталитическую активность, которая в ферментных биосенсорах проявляется в ускорении процесса обмена электронами между субстратом и поверхностью электрода.

Одним из ферментов, которые используются в биосенсорах непосредственно в качестве биокатализатора или в качестве метки, является пероксидаза хрена.

Структура и механизм действия пероксидазы хрена

Пероксидаза — один из наиболее распространенных ферментов, содержащийся в растениях, микробах, тканях животных. Этот фермент катализирует окисление широкого спектра органических соединений пероксидом водорода с образованием токсичных пероксидов, удаляющихся из живых организмов [8]. Пероксидаза представляет собой гликопротеид, состоящий из полипептидной цепи, формирующей двухдоменную глобулу, и гемовой простетической группы с атомом железа, располагающейся между доменами [9]. Отметим, что аминокислотная последовательность изофермента — пероксидазы С — была установлена в 1979 году [10].

Кристаллическая структура рекомбинантной пероксидазы С была определена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,15 Å [11]. Основной отличительной особенностью в структуре пероксидазы хрена по сравнению с другими растительными пероксидазами является наличие участка длиной в 34 аминокислотных остатка между спиралями остатков фенилаланина (F) и глицина G (рис. 1). Эта область, которая является частью канала для доступа субстрата, не встречается у пероксидаз других классов, более того она имеет отличия даже в пределах своего класса, например, в сравнении с арахисовой пероксидазой. Для пероксидазы С хрена, характеризующейся большей F-G-вставкой (на

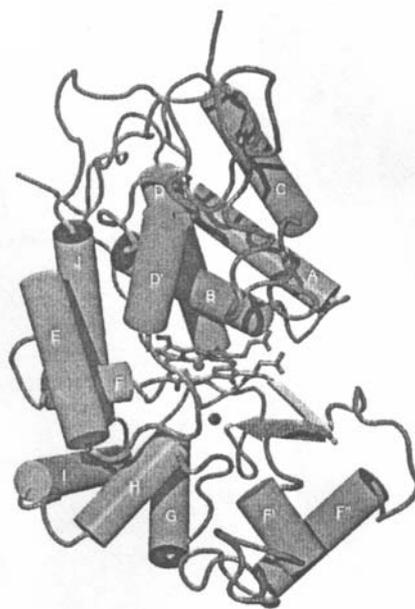
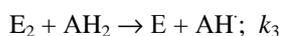
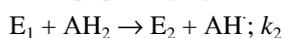
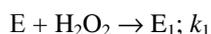


Рис. 1. Пространственная структура пероксидазы С хрена [11]

7 аминокислотных остатков), чем у пероксидазы арахиса, и более короткой F-спиралью, идентифицирован ключевой остаток, способный вступать в прямые взаимодействия с ароматическими донорными молекулами. Изофермент С пероксидазы хрена уникален тем, что имеет кольцо из трех периферийных остатков Phe142, Phe68 и Phe179, которое защищает подход к подвергнутому воздействию краю гема. Эта ароматическая область важна для реализации способности пероксидазы связывать ароматические субстраты.

Особенностью процессов пероксидазного катализа является образование ряда спектрофотометрически различимых комплексов. Упрощенная схема пероксидазного цикла выглядит следующим образом:



E , E_1 , E_2 — соответственно исходная пероксидаза и ее окисленные формы; AN_2 , AN — соответственно исходный субстрат и его окисленная форма.

Продукт первой стадии — E_1 , образующийся при действии пероксида водорода на фермент, впервые был описан в работе [12]. Первоначально предположили, что это соединение является фермент-субстратным комплексом. Однако позже было показано, что оно представляет собой окисленное производное пероксидазы, содержащее два окислительных эквивалента. Методом спектроскопии ЯМР установлено [13], что в E_1 железо имеет формальный заряд +4. Дополнительный окислительный эквивалент в молекуле E_1 локализуется либо на порфириновом макроцикле пероксидазы, либо на одной из функциональных групп фермента.

Донорные субстраты могут восстанавливать соединение E_1 непосредственно в нативный фермент (двух-электронное восстановление) или через образование промежуточного соединения E_2 (одноэлектронное восстановление).

В реакции пероксидазного окисления, помимо пероксида водорода, в качестве окислителя (первого субстрата) могут выступать органические субстраты — алкилгидропероксиды, пероксибензолные кислоты и др. По отношению ко второму субстрату пероксидаза проявляет меньшую специфичность, поэтому целый ряд электронодонорных соединений могут использоваться в качестве субстратов пероксидазы и являться основой детектирующих систем в методах аналитической биохимии и клинической медицины.

Прямые биосенсоры на основе пероксидазы хрена

Биосенсоры с иммобилизованной пероксидазой хрена могут быть использованы в первую очередь для определения субстрата пероксидазы — пероксида водорода. Эта задача весьма актуальна: существует потребность в анализах биологических жидкостей и других растворов для определения пероксида водорода вследствие его ключевой роли в различных процессах, протекающих в человеческом организме и в окружающей среде.

Есть примеры использования нативной пероксидазы хрена в прямых безмедиаторных биосенсорах. Показана возможность развития процесса прямого электронного переноса на поверхности электродов из графита [14], золота и платины [15] с иммобилизованным слоем пероксидазы хрена. Описаны биосенсоры с пероксидазой хрена, иммобилизованной на графитовых электродах, для определения фенола и его производных [16]. Феноксильные радикалы, образующиеся при ферментативном окислении производных фенола в присутствии пероксида водорода, могут быть восстановлены электрохимически; ток восстановления пропорционален их концентрации в растворе. Потенциал, при котором происходит электрохимическое восстановление феноксильных радикалов, зависит от электронодонорных свойств заместителя в молекуле производного фенола. Высокая чувствительность метода была достигнута при определении 2-амино-4-хлорофенола ($85 \text{ нА/см}^2 \cdot \text{мкМ}$) и 4-хлор-3-метилфенола ($14 \text{ нА/см}^2 \cdot \text{мкМ}$).

Пероксидазу хрена использовали в амперометрических биосенсорах для определения общего уровня биогенных аминов, которые являются нейромедиаторами. Предел обнаружения серотонина составил 17 нг/мл , время отклика сенсора $0,5 \text{ с}$, при этом не требовалась предварительная обработка образцов [17].

Существенным недостатком нативной пероксидазы в качестве биораспознающего элемента является то обстоятельство, что регистрируемая скорость прямого переноса электрона на поверхности сенсорного электрода оказывается, как правило, довольно низкой и составляет менее 2 с^{-1} . Это можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, активный центр нативной пероксидазы расположен достаточно глубоко в гидрофобном кармане ее глобулы и расстояние для переноса электрона слишком велико. Во-вторых, гликозилированные остатки на поверхности нативной пероксидазы могут действовать как изолятор и затруднять электронный перенос между активным центром этого фермента и электродом. По этим причинам применение нативной пероксидазы хрена не всегда позволяет получить безмедиаторную сенсорную систему с хорошим откликом.

В связи с развитием методов генной инженерии появилась возможность получать рекомбинантные формы белков, структура которых позволяет сократить расстояние между активным центром биомолекулы и поверхностью электрода. В работе [18] изучалась электрохимическая активность различных форм пероксидазы хрена — нативной и рекомбинантной. Использовалась рекомбинантная пероксидаза, полученная методом генной инженерии, которая в отличие от нативной пероксидазы не содержит углеводных остатков и поэтому имеет меньший размер по сравнению с нативным ферментом. Кроме того, была получена рекомбинантная форма пероксидазы, в молекулу которой на C-конец при экспрессии были введены шесть гистидиновых остатков. Известно, что гистидины сравнительно легко адсорбируются на золоте. В нейтральной среде гистидин взаимодействует с поверхностью золотого электрода по

хемосорбционному механизму [19] возможно посредством атома азота имидазольного кольца. При значениях pH в кислотной области адсорбция осуществляется через атомы кислорода карбоксильной группы гистидина. Адсорбция гистидина на золоте носит электростатический характер. Электроокисление самого гистидина протекает только при очень больших концентрациях и высоких потенциалах, поэтому не мешает проведению анализа. В работе [20] исследовано влияние длины полигистидинового фрагмента на адсорбцию фермента на поверхности золота. Лучшие результаты были получены при введении шести гистидиновых остатков на С-конец молекулы фермента. Дальнейшее увеличение количества гистидиновых остатков затрудняет экспрессию и восстановление фермента.

Для рекомбинантных форм пероксидазы зафиксирован процесс прямого переноса электронов [18], скорость которого больше чем на порядок по сравнению с нативным ферментом, что позволяет сконструировать очень чувствительный биосенсор для определения пероксида водорода. С использованием вращательного дискового электрода была оценена константа гетерогенного переноса электрона для молекул пероксидазы, иммобилизованных на поверхности этого электрода [21]. Если для нативной пероксидазы значение константы равно $1,2 \text{ с}^{-1}$, то в случае рекомбинантной пероксидазы константа переноса электрона на один порядок больше и составляет 18 с^{-1} , а для мутантных форм она увеличивается до 32 с^{-1} . Биосенсор для определения пероксида водорода, сконструированный на основе рекомбинантной пероксидазы с шестью гистидиновыми остатками на конце молекулы, обладает очень высокой чувствительностью, предел обнаружения пероксида водорода 10 нМ [22]. На рис. 2 приведены гра-

дуировочные графики определения пероксида водорода.

Изучение влияния pH и доноров протона на константу скорости гетерогенного переноса электронов показало существенное повышение эффективности электронного переноса с увеличением концентрации H^+ [23].

Биосенсоры на основе пероксидазы хрена с использованием медиаторов

Важным направлением в развитии ферментативных методов анализа является использование сопряженных реакций, катализируемых различными ферментами. Напомним, что сопряженными называются ферментные системы, в которых продукты первой ферментативной реакции служат субстратами для второй реакции и так далее. Используя сопряженные реакции, можно существенно повысить чувствительность анализа, а также упростить детектирование определяемого вещества. В биосенсорах, основанных на использовании сопряженных систем, на поверхности электродов иммобилизуют совместно два разных фермента; конечные продукты реакции определяют электрохимическими методами.

Многие ферменты-оксидазы катализируют окисление различных веществ с образованием пероксида водорода. Прямое электрохимическое детектирование H_2O_2 часто затруднено из-за высокого значения требуемого потенциала, которое может привести к окислению других соединений, мешающих определению пероксида, например аскорбата. Однако пероксид водорода может быть определен электрохимически с использованием пероксидазы как биокатализатора для химического восстановления H_2O_2 . Этот подход реализован в биосенсорах на основе сопряженных ферментных систем с участием пероксидазы. При иммобилизации фермента не всегда удается ориентировать его активный центр таким образом, чтобы был возможен прямой обмен электронами между активным центром и поверхностью электрода. В этом случае для переноса электронов используются низкомолекулярные переносчики электронов — медиаторы. Такие биосенсоры перспективны для создания систем контроля различных метаболитов и проведения мониторинга организма.

На основе сопряженных полиферментных систем разработан ряд биосенсорных устройств для определения L-аминокислот, глюкозы, лактата, оксалата и множества других соединений. Классическим примером таких устройств являются биосенсоры для определения глюкозы. В этих биосенсорах на поверхности электродов совместно иммобилизованы глюкозооксидаза и пероксидаза. Окисление глюкозы сопровождается образованием пероксида водорода, ферментативное восстановление которого с участием пероксидазы детектируется электрохимически. Описано совместное использование этой биферментной системы, которую наносили на электроды, изготовленные из золотых нанотрубок, модифицированных меркаптоэтиламином [24]. В качестве медиатора использовали гидрохинон. Сравнительные определения глюкозы на электродах с ферментами, иммобилизованными в монослой и на двух слоях нанотрубок, по-

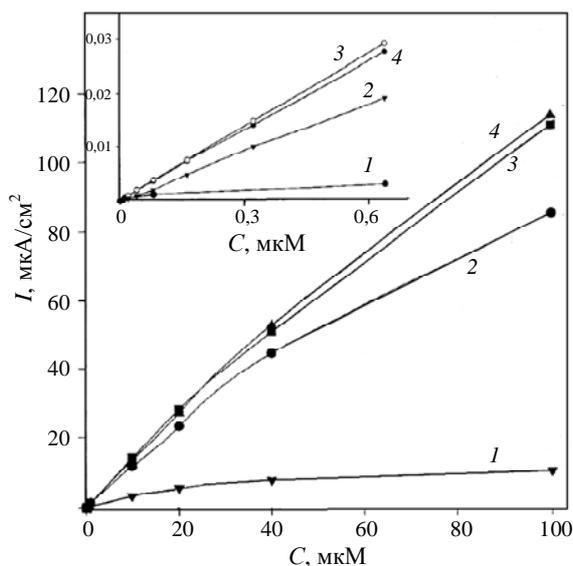


Рис. 2. Зависимость предельного кинетического тока электрохимического биосенсора от концентрации H_2O_2 .

На поверхности золотого электрода иммобилизованы нативная пероксидаза (1), рекомбинантная пероксидаза (2), рекомбинантная пероксидаза с шестью гистидиновыми остатками на N (3) и C (4) концах

казали преимущества электродов, работающих при наложении отрицательного потенциала ($-0,2$ В, х.с.э.).

Принцип совместной иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидазы реализован также в биосенсорах для определения количества сахара в грейпфрутовом соке и в белом вине [25], предел обнаружения глюкозы $4,37$ мкмоль/дм³. В качестве медиатора использовали ферроцианид калия.

Описан амперометрический биосенсор с электродом, поверхность которого модифицирована двумя ферментами — холестериноксидазой и пероксидазой, для определения холестерина [26]. В качестве медиатора использовали ферроцен.

Иммунобиосенсоры с пероксидазой хрена в качестве метки

Пероксидаза применяется в качестве метки одного из биокомпонентов в биосенсорах, основанных на принципах иммунохимического распознавания. В этих биосенсорах осуществляется реакция антиген—антитело, что существенно улучшает специфичность распознавания определяемого вещества в образцах сложного состава, а использование фермента значительно повышает чувствительность метода. Благодаря относительно невысокой стоимости пероксидазы в сравнении с флуоресцентными или радиоактивными метками, биосенсоры с пероксидазой в качестве метки получили широкое распространение.

Иммуносенсоры имеют преимущество при выполнении анализов, когда требуется высокая чувствительность определения. Это необходимо в медицинской практике для диагностики различных биологически активных соединений, для контроля качества продуктов питания, экологического контроля объектов окружающей среды на наличие остаточных количеств загрязнителей и токсикантов. Иммуносенсоры особенно перспективны для проведения медицинских исследований, так как они обеспечивают необходимую чувствительность и специфичность при анализе сложных по составу биологических жидкостей. Недостаточно широкое внедрение био- и иммуносенсоров в медицинскую практику связано с тем, что они не позволяют, как правило, определять несколько соединений одновременно [27].

Предложен высокочувствительный метод определения токсинов цианобактерий в водорослях и речной воде [28], основанный на схеме конкурентного иммуноферментного анализа с электрохимической детекцией пероксидазы. Измерения проводятся при потенциале рабочего электрода -200 мВ (х.с.э.). В качестве медиатора используется 5-метилфеназинметилсульфат.

Разработан способ определения нонилфенола с помощью амперометрического биосенсора [29]. На поверхности электродов, полученных методом трафаретной печати, иммобилизованы специфические антитела к нонилфенолу и пероксидаза хрена. Принцип определения основан на ускорении окисления медиаторов пероксидазы (метиленовый синий, гидрохинон, иодид калия) в присутствии нонилфенола. Предел обнаружения нонилфенола 10 мкг/л.

Описан иммуносенсор с электродами, изготовленными методом трафаретной печати, для определения афлатоксина М1 в молоке [30]. Определение основано на принципе конкурентного иммуноанализа с пероксидазой хрена в качестве метки. Активность пероксидазы детектируется амперометрически при потенциале рабочего электрода -100 мВ. Сравнение чувствительности определения токсина при использовании спектрофотометрического и электрохимического методов детекции показало преимущество последнего, обеспечивающего определение афлатоксина М1 с пределом обнаружения 25 ppb.

ДНК-сенсоры с пероксидазой хрена в качестве метки

Разработаны биосенсоры, основанные на использовании ДНК или олигонуклеотидов в качестве биораспознающих реагентов и пероксидазы хрена в качестве метки. В большинстве подобных систем применяются ДНК-зонды, содержащие биотинилированные нуклеотиды. При этом зонд, меченный биотином, гибридизуют с ДНК-мишенью, затем последовательно добавляют авидин или стрептавидин и биотинилированный фермент, в качестве которого может быть использована пероксидаза хрена. Альтернативой может служить конъюгат пероксидазы со стрептавидином, имеющим сайт связывания с биотином. Такой подход был использован при разработке электрохимического сенсора для определения человеческого цитомегаловируса [31]. Детекцию проводили методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Биосенсор имеет высокий предел обнаружения ($0,6$ пикоМ амплифицированного фрагмента ДНК вируса), что в 23000 раз чувствительнее, чем электрофоретическое определение в агарозном геле и в 83 раза чувствительнее колориметрического метода определения результата гибридизации в планшетах.

Разработана система электрохимических биосенсоров для определения патогенных бактерий в моче [32]. Система состоит из 16 сенсоров с золотыми электродами, на которых иммобилизованы олигонуклеотиды, специфичные для групп *E.coli*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*. В качестве метки используется флуоресцеин, который выявляется конъюгатом антител к флуоресцеину с пероксидазой хрена. Для определения активности пероксидазы используется субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), который одновременно служит как медиатор — переносчик электронов. Метод позволяет определять до 2600 уропатогенных бактерий в культуре и клинических образцах, продолжительность анализа 45 мин.

В работе [33] предложен высокочувствительный метод количественного определения ДНК и РНК как непосредственно в образцах, так и после амплификации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При проведении ПЦР используются меченые праймеры: в качестве метки одного праймера служит биотин, второго праймера — флуоресцеин. На поверхности электродов иммобилизовали конъюгат нейтроавидина с коллоидным золотом. Образец ДНК после ПЦР наносили на

электрод, результат взаимодействия меченой ДНК с нейтроавидином выявлялся конъюгатом антител к флуоресцеину с пероксидазой. Для детекции электрохимической активности пероксидазы использовали метод прерывистой импульсной амперометрии с ТМБ качестве медиатора. Предел обнаружения составил 1 миллион молекул (10^{-18} моль) нуклеиновой кислоты без амплификации и около 50 молекул в случае реакций амплификации. Время анализа 15—30 мин.

Очень интересен и перспективен ДНК-сенсорный метод, чувствительность которого к ДНК может быть повышена путем введения в процесс анализа дополнительных молекул метки — биотина [34]. Как и в предыдущих методах, проводится гибридизация ДНК, меченой биотином, затем связывание биотина на поверхности с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Метод усиления аналитического сигнала основан на способности пероксидазы окислять производные тирамина с образованием промежуточных высокоактивных радикальных частиц, которые затем могут ковалентно связываться с поверхностью белковой глобулы фермента в непосредственной близости от активного центра фермента — источника их образования. Радикальные частицы, иммобилизованные на поверхности вблизи фермента, могут быть также выявлены конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Таким образом, на поверхность вводятся дополнительные молекулы пероксидазы, что обеспечивает расширение диапазона аналитического сигнала.

Заключение

В настоящее время потребность в биосенсорах огромна, поскольку они не требуют сложного или дорогого оборудования, могут использоваться в полевых условиях и даже быть имплантированы в человеческий организм для непрерывного мониторинга различных биологически активных соединений.

Для расширения аналитических возможностей электрохимических биосенсоров ведутся работы по усовершенствованию методов иммобилизации биокомпонента на электроде, по миниатюризации сенсорных элементов, по увеличению стабильности биочувствительных элементов. Основное ограничение использования биосенсоров в области медицины и охраны окружающей среды связано с необходимостью применения одного типа сенсора для определения только одного соединения.

Развитие принципов биосенсорного анализа направлено на решение задачи определения нескольких веществ одновременно. В мультибиосенсорных устройствах пероксидаза хрена сохраняет свои преимущества как компонент сопряженных ферментных систем, так и в качестве метки биораспознающего элемента.

ЛИТЕРАТУРА

- Turner A., Karube I., Wilson G. Biosensors, fundamentals and applications. Oxford: Oxford University Press, 1987, 240 p.
- Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Сенсоры, 2002, т. 1, с. 16—24.
- Mauk A.G., Scott R.A., Gray H.B. J. Am. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 13, p. 4360—4363.
- Григоров Л.Н., Чернавский Д.С. Биофизика, 1972, т. 17, № 2, с. 195—202.
- Кулис Ю.Ю., Разумас В.Й. Биокатализ в электрохимии органических соединений. Вильнюс: Москлас, 1983, 168 с.
- Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры: основы и приложения. М.: Мир, 1992, 614 с.
- Schmidt H.-L., Schuhmann W. Biosens. Bioelectron., 1996, v. 11, № 1/2, p. 127—135.
- Huddleston S., Robertson S., Dobson C., Kwong F.Y.P., Chamralambous B.M. Biochemical Society Transaction, 1995, v. 23, № 1, p. 108S.
- Упоров И.В., Егоров А.М. Докл. АН, 1997, т. 356, № 5, с. 696—699.
- Welinder K.G. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 483—502.
- Gajhede M., Schuller D.J., Henriksen A., Smith A.T., Poulos T.L. Nat. Struct. Biol., 1997, v. 4, № 12, p. 1032—1040.
- Theorell H. Ark. Kemi. Min. Geol. A, 1942, v. 16, p. 1—11.
- Tsurumaki H, Watanabe I, Morishima I. J. Am. Chem. Soc., 1993, v. 115, p. 11784—11788.
- Lindgren A., Ruzgas T., Gorton L., Csoregi E., Ardila G.B., Sakharov I.Y., Gazaryan I.G. Biosens. Bioelectron., 2000, v. 15, № 9—10, p. 491—497.
- Lotzbeyer T., Schuhmann W., Schmidt H.-L. Sensors and Actuators B, 1996, v. 33, p. 50—54.
- Ruzgas T., Enneus J., Gorton L., Marco-Varga G. Anal. chim. acta, 1995, v. 311, p. 245—253.
- Castilho T.J., Sotomayor M.T., Kubota L.T. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, v. 37, p. 785—791.
- Presnova G., Grigorenko V., Egorov A., Ruzgas T., Lindgren A. e. a. Faraday Discuss., 2000, v. 116, p. 281—289.
- Худяков П.В., Солошко С.В., Сафронов А.Ю. Электрохимия, 1997, т. 33, № 10, с. 1165—1171.
- Hochuli E., Bannwarth W., Doebeli H., Gentz R., Stueber D. Bio. Technology, 1998, v. 6, p. 1321—1325.
- Ferapontova E.E., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Borchers T., Ruzgas T., Gorton L. J. of Electroanalytical Chemistry, 2001, v. 509, p. 19—26.
- Ferapontova E.E., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Borchers T. e.a. Biosens. Bioelectron., 2001, v. 16, № 3, p. 147—157.
- Ferapontova E., Gorton L. Bioelectrochemistry, 2002, v. 55, № 1—2, p. 83—87.
- Delvaux M., Walcarius A., Demoustier-Champagne S. Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20, № 8, p. 1587—1594.
- Gonzalo-Ruiz J., Asuncion Alonso-Lomillo M., Javier Munoz F. Ibid., 2007, v. 22, № 7, p. 1517—1521.
- Kumar A., Rajesh, Grover S.K., Malhotra B.D. Anal. chim. acta, 2000, v. 414, p. 43—50.
- Malhotra B.D., Chaubey A. Sensors and Actuators B, 2003, v. 91, p. 117—127.
- Campas M., Marty J.L. Biosens. Bioelectron., 2007, v. 22, № 6, p. 1034—1040.
- Evtugyn G.A., Eremin S.A., Shaljamova R.P., Ismagilova A.R., Budnikov H.C. Ibid., 2006, v. 22, № 1, p. 56—62.
- Micheli L., Grecco R., Badea M., Moscone D., Palleschi G. Ibid., 2005, v. 21, № 4, p. 588—596.
- Azek F., Grossiord C., Joannes M., Limoges B., Brossier P. Anal. Biochem., 2000, v. 284, p. 107—113.
- Liao J.C., Mastali M., Gau V., Suchard M.A., Moller A.K., Bruckner D.A., Babbitt J.T., Li Y., Gornbein J. e.a. J. Clin. Microbiol., 2006, v. 44, № 2, p. 561—570.
- Wojciechowski M., Sundseth R., Moreno M., Henkens R. Clin. Chem., 1999, v. 45, № 9, p. 1690—1693.
- Qian X., Bauer R.A., Xu H.S., Lloyd R.V. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology, 2001, v. 9, p. 61—69.