

УДК 543.553

ПЛАНАРНЫЕ ТИОЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СЕНСОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И АНАЛИЗА ЕЕ ИНГИБИТОРОВ

Еременко А.В.^{1*}, Прокопкина Т.А.², Касаткин В.Э.³, Осипова Т.А.², Курочкин И.Н.²

*(¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ²Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; *e-mail: eremenkoav@yandex.ru)*

Предложен способ проведения анализа тиохолина, активности фермента бутирилхолинэстеразы (БХЭ) и ее ингибиторов с помощью разработанных тиол-чувствительных комбинированных планарных сенсоров. Чувствительность сенсоров к тиохолину обеспечивается медиаторным слоем диоксида марганца, сформированным на рабочем углеродном электроде. Предел обнаружения для БХЭ и ее ингибитора диазинона составил $1 \cdot 10^{-10}$ М и $1 \cdot 10^{-9}$ М соответственно. Разработанный подход значительно упрощает проведение анализа ингибиторов и может использоваться для контроля качества воды и экологического мониторинга.

Ключевые слова: диоксид марганца, планарные сенсоры, бутирилхолинэстераза, ингибитор.

Ферменты класса холинэстераз (ХЭ) широко используются при разработке различных биосенсорных устройств в целях высокочувствительного и селективного мониторинга токсичности в экологических исследованиях, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, для военного и медико-биологического применения [1]. Эти устройства основаны на ингибировании ХЭ нейротоксинами, такими как фосфорорганические соединения и карбаматы. Основная мотивация разработки таких биосенсоров – поиск надежной альтернативы инструментальным методам, используемым в аналитических лабораториях. Следует отметить, что эти методы, являясь мощным инструментом мониторинга токсичных фосфорорганических и карбаматных пестицидов, обладают рядом существенных недостатков, такими как высокая стоимость оборудования, трудоемкость и продолжительность подготовки анализа, а следовательно, невозможность проведения анализа в режиме реального времени, а также высокие требования к квалификации персонала. Кроме того, они не в состоянии предоставить какую-либо информацию о потенциальной токсичности образца.

Биосенсорные устройства позволяют определять не только присутствие и количество отдельных химических соединений, но и вызванные ими биологические эффекты [2], например нейротоксичность, т.е. получать дополнительную информацию, которая в некоторых случаях является более значимой, чем хи-

мический состав анализируемого образца. В связи с этим в настоящее время особое внимание уделяется биоаналитическим системам, основанным на ингибировании ферментов, которые разрабатываются для оценки нейротоксичных пестицидов (фосфорорганические и карбаматные) ингибиторов холинэстераз [3]. Наиболее перспективными и чувствительными методами регистрации данных соединений являются электрохимические сенсоры, основанные на анализе тиохолина – продукта ферментативного гидролиза. В целях повышения чувствительности поверхность таких сенсоров подвергают модификации различными медиаторами – веществами, способными к циклическому окислению-восстановлению на электроде. К таким медиаторам относятся многие соединения переходных металлов (оксиды меди, марганца и кобальта), комплексные соединения (гексацианоферраты, фталоцианины и т.д.).

В последнее время диоксид марганца стали использовать в качестве катализатора для окисления серосодержащих органических соединений, в частности, для решения экологических проблем [4]. В то время как другие катализаторы, представляющие собой оксиды металлов, легко отравляются серой, диоксид марганца показал хорошую стабильность [5]. Проведенное нами ранее сравнительное исследование разных кристаллических модификаций диоксида марганца для электрохимического определения тиолов показало, что наибольшей каталитической ак-

тивностью обладают электроды, модифицированные γ -MnO₂ [6]. Низкий предел обнаружения тиохолина (60 нМ), полученного с использованием планарных электродов, модифицированных γ -MnO₂, позволил разработать высокочувствительный анализ БХЭ и ее ингибитора диазинона [6]. Способ проведения анализа заключается в определении активности БХЭ в кинетическом режиме путем измерения начальной скорости накопления тиохолина в процессе ферментативного гидролиза пропионилтиохолина в электрохимической ячейке с перемешиванием. В данном формате проводился также анализ ингибиторов фермента.

В данной работе мы исследовали новый способ измерения тиосоединений, активности фермента БХЭ и анализа ее ингибиторов с помощью комбинированных сенсоров, содержащих на одной подложке модифицированный диоксидом марганца углеродный рабочий электрод, хлоридсеребряный электрод сравнения и платиновый вспомогательный электрод. Измерения проводили путем анализа хроноамперометрических кривых при стационарном потенциале.

Материалы и методы

Реагенты. В работе использованы следующие реактивы: бутирилхолинэстераза из плазмы лошади (БХЭ, ЕС 3.1.1.8), активность 264 У/мг, бычий сывороточный альбумин (БСА), бутирилтиохолин хлорид, 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота (ДТНБ), буфер НЕРЕС фирмы «Sigma»; перманганат калия KMnO₄, четырехводный ацетат марганца (II) Mn(Ac)₂·4H₂O, бром, калия хлорид, калия бромид фирмы «Merck», диазинон (1·10⁻² М раствор в изопропанол). Все водные растворы готовили с использованием деионизованной воды, полученной системой очистки воды «MilliQ» (удельное сопротивление 18,2 МΩ·см).

Модификация электродов диоксидом марганца. Золи диоксида марганца получали смешением разбавленных водных растворов перманганата калия и ацетата марганца, как описано в работах [5, 6]. На поверхность рабочего электрода (рабочий электрод изготовлен из углерода, электрод сравнения – из хлорида серебра, вспомогательный – из платины), предоставленного фирмой «BTV» (Чешская республика), наносили каплю свежеприготовленного раствора диоксида марганца объемом 2 мкл, электрод высушивали на воздухе при комнатной температуре. Процедуру повторяли, затем электрод промывали бидистиллированной водой и после удаления излишков воды прогревали в течение 1 ч при 60°C в термостате.

Линейную вольтамперограмму модифицированных диоксидом марганца сенсоров регистрировали в интервале потенциалов от 300 до 800 мВ при скорости развертки, равной 20 мВ/с. Все электрохимические измерения проводили в 50 мМ буфере (Нерес с 30 мМ KCl, pH 7,5) с помощью потенциостата «IPC-Compact» («Кронас», Россия).

Анализ тиохолина. Тиохолин получали в ходе ферментативного гидролиза бутирилтиохолин хлорида (БТХ) по методике, описанной в [6]. Для этого 22,6 мг БТХ растворяли в 600 мкл 50 мМ буфера (Нерес, 30 мМ KCl, pH 7,5), добавляли 400 мкл раствора БХЭ (1 мг/мл) в том же буфере, смесь инкубировали в течение 1 ч.

Для определения концентрации тиохолина в полученном запасном растворе использовали метод Элмана. Раствор тиохолина разводили в 400 раз 50 мМ буфером (Нерес, 30 мМ KCl, pH 7,5) и 100 мкл вносили в лунку плашечного спектрофотометра «Reader HT1» («Anthos», Австрия), добавляли 100 мкл раствора ДТНБ (6 мМ) и измеряли оптическую плотность при 405 нм [6]. Амперометрические измерения тиохолина с помощью комбинированных сенсоров проводили без перемешивания в ячейке объемом 1 мл, куда помещали 990 мкл буферного раствора (50 мМ НЕРЕС, 30 мМ KCl, pH 7,5), подавали потенциал 600 мВ, после выхода базовой линии вводили в ячейку аликвоту анализируемого раствора и фиксировали изменение тока через 80 с. За изменениями величины тока следили при помощи управляемого компьютером потенциостат-гальваностата «IPC-Compact» («Кронас», Россия).

Измерение активности БХЭ в режиме наработки продукта. Регистрацию отклика на тиохолин, полученный в ходе ферментативной реакции, осуществляли в режиме наработки продукта. Измерение проводили в электрохимической ячейке, описанной выше. Раствор субстрата готовили разведением навески бутирилтиохолин хлорида в воде. Концентрация запасного раствора составляла 21 мМ. Раствор фермента готовили последовательным разведением раствора (1 мг/мл) с использованием буфера НЕРЕС с добавлением БСА (1 мг/мл).

В ячейку объемом 1 мл вводили 900 мкл буфера НЕРЕС с добавлением БСА (1 мг/мл) и 100 мкл раствора фермента необходимой концентрации. Через 10 мин 900 мкл данной смеси переносилось в ячейку с 45 мкл раствора субстрата. Реакцию инкубации проводили в течение 10 мин. Отклик регистрировали через 80 с после подачи потенциала. После каждого измерения тиохолина проводили предварительные

измерения отклика на раствор субстрата для нормировки активности электрода и оценки спонтанного гидролиза бутирилтиохолина. За изменениями величины тока следили с помощью специально написанной компьютерной программы для потенциостата «IPC-Micro».

Электрохимический анализ ингибиторов холинэстераз. Для проведения электрохимического анализа ингибиторов холинэстеразной активности использовали планарные электроды фирмы «BVT» (Чешская Республика). В пробирку объемом 1 мл вводили 700 мкл буфера HEPES с добавлением БСА (1 мг/мл), 200 мкл раствора фермента с концентрацией $5 \cdot 10^{-9}$ М (концентрация фермента в ячейке составляла $1 \cdot 10^{-9}$ М) и 100 мкл раствора ингибитора необходимой концентрации. Через 10 мин 900 мкл данной смеси переносилось в пробирку с 45 мкл раствора субстрата. Инкубацию с субстратом проводили в течение 10 мин (в этом интервале ферментативная реакция гидролиза имеет линейную зависимость от времени). После этого электрод переносили в пробирку и через 80 с регистрировали величину тока. Раствор ингибитора готовили последовательным разведением $1 \cdot 10^{-2}$ М растворов в изопропанол 50 мМ буфером HEPES (pH 7,5), содержащим 30 мМ KCl. Ингибитор диазинон (ДЗ) предварительно переводили в оксонную форму, более эффективно взаимодействующую с ферментом, окисляя его бромной водой. Для приготовления бромной воды к 0,5 М водному раствору бромида калия добавляли жидкий бром из расчета 8 мкл брома на 25 мл раствора KBr, смесь интенсивно встряхивали до получения гомогенного раствора. Для окисления использовали растворы 10^{-5} М ингибитора в буфере HEPES, которые смешивали с бромной водой в соотношении 1:1, встряхивали и выдерживали 3 мин, затем разбавляли буфером до нужной концентрации.

Результаты и их обсуждение

Выбор рабочего потенциала и способа измерения тиохолина. На рис. 1 представлена схема амперометрического определения тиохолина с помощью

планарных сенсоров, модифицированных диоксидом марганца. Аналитический отклик сенсора формируется за счет восстановления Mn(IV) до Mn(II/III) на рабочем электроде в присутствии тиохолина с последующим электрохимическим окислением медиатора до Mn(IV) при положительном потенциале.

Для выбора рабочего потенциала были исследованы вольтамперные характеристики электродов, модифицированных диоксидом марганца. На рис. 2 представлена разностная линейная вольтамперограмма для концентрации тиохолина $1 \cdot 10^{-3}$ М. При потенциалах выше 480 мВ наблюдается резкое увеличение тока сенсора, что указывает на проявление медиаторных свойств диоксида марганца в присутствии тиохолина. Для дальнейшей работы был выбран потенциал 600 мВ, при котором наблюдается близкий к максимальному амперометрический сигнал.

В целях упрощения процедуры проведения анализа мы рассматривали вариант электрохимического измерения тиохолина, при котором тиол-чувствительный сенсор, состоящий из трех электродов, погружался в анализируемую пробу, затем подавался потенциал (600 мВ относительно Ag/AgCl электрода сравнения) и фиксировались хроноамперометрические кривые. Простейшей физико-химической моделью, описывающей происходящие в данном случае процессы, является модель убывающего во времени диффузионного тока при постоянном потенциале. Согласно этой модели, зависимость величины тока (i) от времени подчиняется уравнению Коттрелла:

$$i = nFAC_0 \sqrt{\frac{D}{\pi t}},$$

где n – количество электронов, участвующих в элементарном акте окисления/восстановления, F – постоянная Фарадея 96485 К/моль, A – площадь рабочей поверхности (см^2), C_0 – начальная концентрация электроактивного вещества (моль/ см^3), D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$), t – время (с). Согласно данному уравнению ток, взятый в определенный момент време-

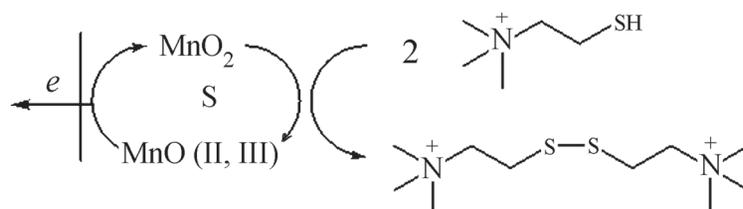


Рис. 1. Схема амперометрического анализа тиохолина на планарном углеродном электроде, модифицированном MnO₂

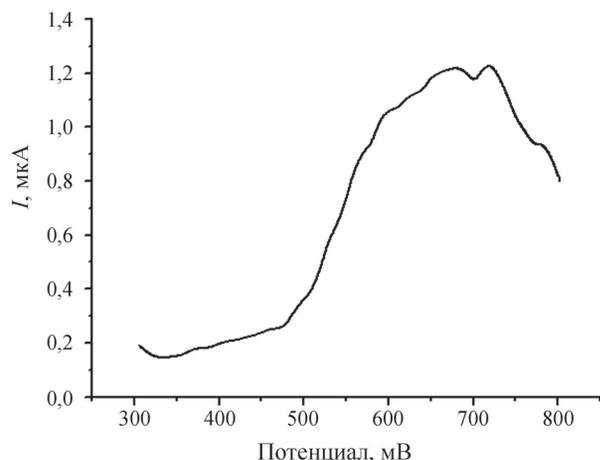


Рис. 2. Разностная линейная вольтамограмма, полученная для сенсора, модифицированного MnO_2 , при концентрации тиохалина $1 \cdot 10^{-3}$ М в буфере 50 мМ НЕРЕС, 30 мМ КСl, рН 7,5; скорость сканирования 20 мВ/с

ни после подачи потенциала на электрод, будет прямо пропорционален концентрации электроактивного вещества в растворе, т.е. в нашем случае тиохалина.

Характерный вид хроноамперометрических кривых ($i - t$) для разных концентраций тиохалина представлен на рис. 3, А, где видно, что величина тока растет с повышением концентрации тиохалина. Те же данные в координатах $i - t^{-1/2}$ (в диапазоне 20–100 с) представлены на рис. 3, Б. Выбор именно такого временного диапазона продиктован, с одной стороны, минимизацией времени измерения, а с другой – тем, что некоторое время после подачи потенциала в суммарную величину тока вносит большой вклад не только диффузионный, но и емкостной ток, что

приводит к значительному отклонению от уравнения Коттрелла. Линейность данной зависимости тока от $t^{-1/2}$ в данном диапазоне (рис. 3, Б) позволяет выбрать любое удобное для проведения анализа время. При этом величина тока будет являться аналитическим сигналом.

Аналитические характеристики электродов, анализ активности БХЭ и диазинона. Аналитические параметры электродов оценивались на основании полученной градуировочной зависимости тока от концентрации тиохалина при фиксированном времени 80 секунд. Данное значение времени было выбрано на линейном участке зависимости $i - t^{-1/2}$ (рис. 3, Б). Основные аналитические характеристики тиол-чувствительных электродов при измерении тиохалина представлены в таблице. Полученные аналитические характеристики, а именно линейный диапазон, предел обнаружения, чувствительность, а также операционная стабильность (изменение отклика за одно измерение), тиол-чувствительных сенсоров позволяют с необходимой чувствительностью определять тиохалин. В дальнейших экспериментах такие сенсоры были использованы для определения активности фермента БХЭ и проведения анализа ингибиторов этого фермента.

Анализ активности БХЭ проводили в описанном режиме наработки продукта. На рис. 4 представлена градуировочная зависимость отклика сенсоров от концентрации БХЭ. Изученный диапазон концентраций фермента составлял $1 \cdot 10^{-10}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ М. Зависимость имеет линейный характер ($R^2 = 0,998$), рассчитанный предел обнаружения для фермента составляет $1 \cdot 10^{-10}$ М. Чувствительность электродов ($1040 \text{ нА/М} \cdot \text{см}^2$) позволила использовать их для

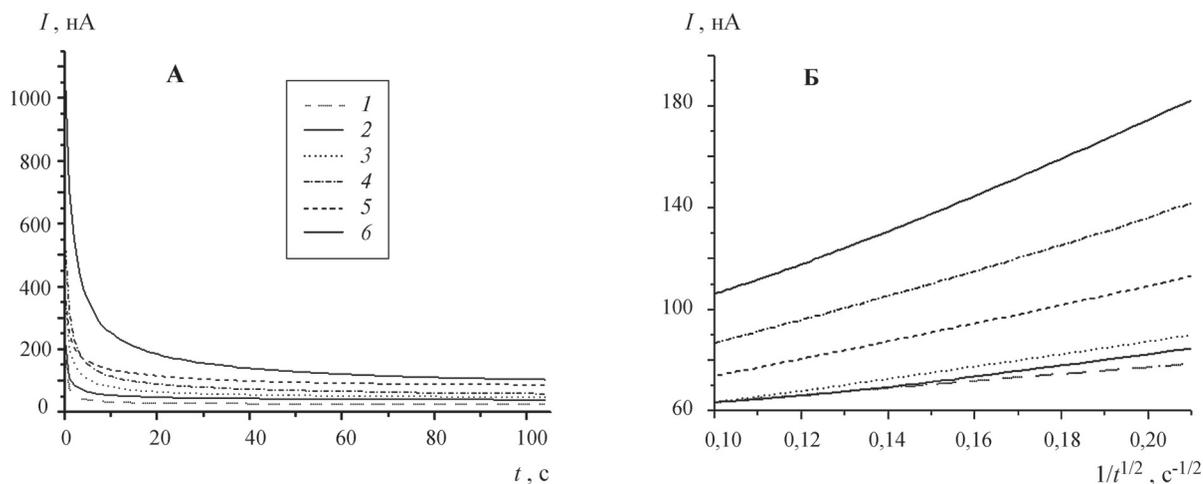


Рис. 3. Зависимость диффузионного тока (А) от времени (t) для разных концентраций тиохалина, мкМ (1 – 10, 2 – 30, 3 – 60, 4 – 100, 5 – 150, 6 – 200); зависимость тока от $t^{-1/2}$ в диапазоне 20–100 с (Б)

Аналитические характеристики тиол-чувствительных сенсоров

Линейный диапазон (М)	$5 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$
Предел обнаружения (М)	$1 \cdot 10^{-5}$
Чувствительность (мкА/М·см ²)	1650
Изменение отклика за одно измерение (%)	1

анализа необратимого ингибитора БХЭ. В настоящей работе рассматривался только вариант необратимого ингибирования, а модельным ингибитором БХЭ был выбран фосфорорганический пестицид диазинон.

Концентрацию диазинона определяли по степени уменьшения начальной скорости ферментативной реакции гидролиза бутирилтиохолина после предварительной инкубации БХЭ с пробой, содержащей ингибитор, в течение фиксированного времени [6]. В этом случае использовали отношение начальной скорости ферментативной реакции (E) после предварительной инкубации с ингибитором к начальной скорости ферментативной реакции, измеренной без ингибитора (E_0). Линейную зависимость между концентрацией ингибитора $C_0^{\text{инг}}$ и логарифмом относительной ферментативной активности $\ln(E/E_0)$ представляется следующим уравнением:

$$\ln([E]/[E]_0) = k^{\text{инг}} C_0^{\text{инг}} \tau.$$

Наклон этой зависимости связан с чувствительностью определения необратимого ингибитора, которая зависит от величины константы скорости ингибирования $k^{\text{инг}}$, а также от длительности инкубации фермента с ингибитором (τ) [7]. В экспериментах по ингибированию использовали концентрацию БХЭ $5 \cdot 10^{-10}$ М, а время инкубации с разными концентрациями диазинона составляло 10 мин. Данные по определению диазинона с использованием фермента БХЭ и тиол-чувствительных сенсоров представлены на рис. 5 в полулогарифмических координатах. Достоверно определяемая степень ингибирования БХЭ диазиноном, рассчитанная из погрешности определения фермента без ингибитора (E_0), составила 15%, что позволило оценить предел обнаружения по диазинону, который составил $1 \cdot 10^{-9}$ М. Близкий предел обнаружения для диазинона был получен при проведении измерений в кинетическом режиме с перемешиванием [6]. Однако данный способ проведения анализа более трудоемкий по сравнению с предложенным в данной работе и требует дополнительного

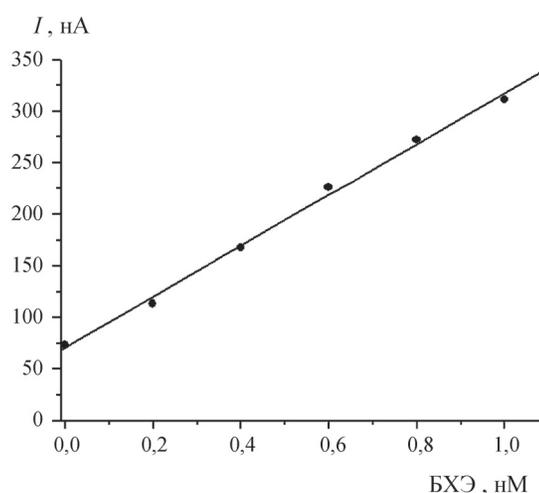


Рис. 4. Зависимость отклика сенсоров от концентрации БХЭ

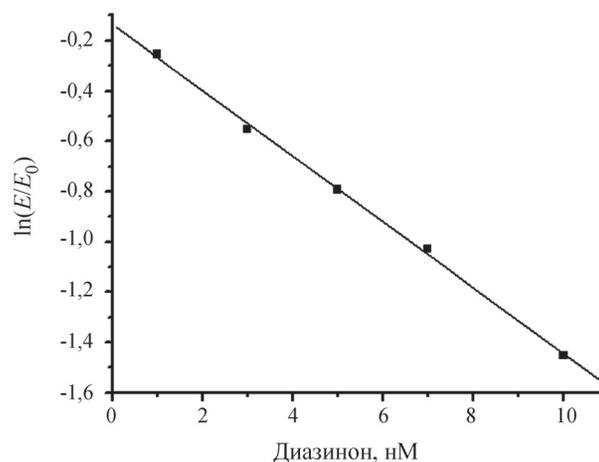


Рис. 5. Зависимость $\ln(E/E_0)$ от концентрации ингибитора диазинона в инкубационной смеси

оборудования. Следует отметить, что разработанные планарные сенсоры с медиаторным слоем диоксида марганца могут многократно использоваться (как минимум 10 раз) для анализа ингибиторов БХЭ без значимого изменения чувствительности.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована возможность использования комбинированных планарных электродов, модифицированных диоксидом марганца в качестве электрохимического медиатора для определения тиохолина, активности бутирилхолинэстеразы и высокочувствительного анализа ее ингибиторов. Разработанный способ измерения значительно упрощает проведение анализа ингибиторов и может найти применение в области контроля качества воды и экологического мониторинга.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-08-01078 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Andreescu S., Marty J-L.* // *Biomol. Engineer.* 2006. **23**. P. 1.
2. *Lee J.H., Mitchell R.J., Kim B.C., Cullen D.C., Gu M.B.* // *Biosens. Bioelectron.* 2005. **21**. P. 500.
3. *Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Barceló D.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. **386**. P. 1025.
4. *Dong J., Zhang L., Liu H, Liu Ch., Gao Yu., Sun L.* // *Frese-
nius Environ. Bull.* 2010. **19**. P. 1615.
5. *Dontsova E.A., Zeifman Y.S., Budashov I.A., Eremenko A.V.,
Kalnov S.L., Kurochkin I. N.* // *Sens. Actuat. B: Chem.* 2011. **159**. P. 261.
6. *Eremenko A. V., Dontsova E. A., Nazarov A. P., Evtushenko E.
G., Amitonov S. V., Savilov S. V., Martynova L. F., Lunin V. V.,
Kurochkin I. N.* // *Electroanal.* 2012. **24**. P. 573.
7. *Еремеев Н.Л., Курочкин И.Н., Еременко А.В., Варфоломеев
С.Д., Райнина Е.И.* // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.*
2002. **43**. С. 412.

Поступила в редакцию 30.01.14

**SCREEN-PRINTED THIOL-SENSITIVE SENSOR ELEMENTS
FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF BUTYRYLCHOLINESTERASE
AND ANALYSIS OF ITS INHIBITORS**

A.V. Eremenko^{1*}, T.A. Prokopkina², V.E. Kasatkin³, T.A. Osipova², I.N. Kurochkin²

*(¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, ²Faculty of Chemistry of M.V. Lomonosov Moscow State University, ³A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS; *e-mail: eremenkoav@yandex.ru)*

A method for analyzing thiocholine, enzyme activity of butyrylcholinesterase (BChE) and their inhibitors using thiol-sensitive planar sensors has been proposed. Sensor sensitivity to thiocholine is provided by mediator layer of manganese dioxide formed on the working carbon electrode. The detection limit for BChE and its inhibitor diazinon was $1 \cdot 10^{-10}$ M и $1 \cdot 10^{-9}$ M, respectively. The developed approach simplifies the analysis of inhibitors and can be used to water quality control and environmental monitoring.

Key words: manganese dioxide, planar sensors, butyrylcholinesterase, inhibitor.

Сведения об авторах: *Еременко Аркадий Вениаминович* – вед. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. биол. наук (eremenkoav@yandex.ru); *Прокопкина Таисия Александровна* – студентка химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (prokopkinatasya@gmail.com); *Касаткин Вадим Эдуардович* – ст. науч. сотр., руководитель отдела разработки средств автоматизации и электронных приборов Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, канд. хим. наук (vadim_kasatkin@mail.ru); *Осипова Татьяна Алексеевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (taosip@gmail.com); *Курочкин Илья Николаевич* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (ikur@genebee.msu.su).