

Изследване на работните характеристики на биосензор с имобилизирана ацетилхолинестераза за определяне на концентрацията на пестициди

Катя Габровска, Настя Василева, Ивайло Маринов, Явор Иванов, Цонка Годжевъргова

Study of operating characteristics of biosensor with immobilized Achetylcholinesterase for detection of pesticide concentration: Polyacrylonitrile (PAN) membrane, modified with NaOH and with entrapped gold nanoparticles (GNPs) was used for immobilization of acetylcholinesterase (AChE). The biosensor for determination of pesticides was constructed from this immobilized system. The electrochemical behaviors of PAN + GNPs + AChE/Pt electrode (voltamperometric curve; amperometric response and amperometric current-time) was studied. The calibration plot of acetylthiocholin and Paraoxon was investigated. The inhibition of AChE by different concentration of Paraoxon was determined.

Key words: Modified membranes, Immobilized achetylcholinesterase, Biosensors, Pesticides.

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните няколко години се засили интересът към изследване на имобилизацията на ензима ацетилхолинестераза (АХЕ) върху различни носители [1]. Причината е, че тези имобилизирани системи са идеални аналитични реагенти за определяне на органофосфорни компоненти (реагенти за химична защита и пестициди). Пестицидите са сред най-известните инхибитори на АХЕ. Механизмът им на действие, тяхната висока токсичност и тяхното широко прилагане в земеделието за защита на посевите от вредители представлява постоянна заплаха за живата природа. Ето защо непрекъснато се увеличава необходимостта от един точен мониторинг на пестицидите в околната среда [2].

Няколко биосензора и поточно-инжекционни системи са конструирани на основата на имобилизирана АХЕ и са използвани както за директно определяне на ацетилтиохолин (АТХ), така и за индиректното определяне на пестициди. Определянето е основано на инхибиращото действие на тези компоненти върху АХЕ, която е ензим с ясна специфичност към АТХ и сродни съединения в нервните тъкани [2,4,6]. В много статии се дискутира въпроса за ролята на различни фактори, които въздействат на аналитичните характеристики на биосензорите – тяхната селективност към определянето на инхибитори, а така също и работните им характеристики [5,8].

В настоящата работа е конструиран биосензор с имобилизирана АХЕ върху модифицирана полиакрилонитрилна (ПАН) мембрана с включени в нея златни частици с наноразмери. Целта е полученият биосензор да се използва за определяне на ниски концентрации на пестицида параоксон.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и реагенти

Като носител за провеждане на имобилизацията на ацетилхолинестераза са използвани мембрани от акрилонитрилов съполимер (акрилонитрил – 91,3%, метилметакрилат – 7,3%, натриев винилсулфонат – 1,4%).

Модификацията на тези мембрани се провежда с разтвор на NaOH и включване на златни наночастици (НЧ) в порите на мембраната (МБ) (Sigma-Aldrich, USA). Златните НЧ са с концентрация $5,74 \times 10^{12}$ бр. за 1 ml колоиден разтвор, а размерът на частичките е 9,7 nm.

Имобилизацията на ацетилхолинестеразата (ЕК 3.1.1.7, 403 U/mg, изолирана от *Electrophorus electricus* (electric eel)), (Sigma-Aldrich, USA) се извършва с 1-етил-3-(3-диметил аминопропил) карбодимид хидрохлорид (ЕДК) (Sigma-Aldrich, USA) върху модифицираните мембрани.

2. Получаване на модифицирана ПАН мембрана с включени златни наночастици (наноструктурирана мембрана)

Мембрана с площ 10 cm^2 се потапя в 10 ml 15% разтвор на NaOH за 20 min при 40°C . След това се промива с дестилирана вода и престоява 120 min в силно разреден разтвор на солна киселина. През получената модифицирана мембрана се пропуска 1 ml колоиден разтвор на златни НЧ под налягане $3 \times 10^5 \text{ Pa}$. Промива се с дестилирана вода. Мембраната се поставя в 1 mM разтвор на меркаптопропионова киселина за 20 часа, при 4°C . Следва многократно промиване на мембраната с дестилирана вода.

3. Имобилизация на АХЕ върху наноструктурираната мембрана

Модифицираната мембрана се поставя в 1 mM разтвор на карбодиимид (pH 4,75) за 80 min при температура 20°C . Мембраната се промива с 4 l дестилирана вода до пълното отстраняване на нереагиращия карбодиимид и към нея се прибавя 1 ml $0,025\%$ разтвор на АХЕ (в натриевофосфатен буфер с pH 7,6). Мембраната престоява в ензимния разтвор 15 h при температура 4°C . Имобилизираният ензим и мембраната се отмиват с 2 l бидестилирана вода и 100 ml $0,1 \text{ M}$ разтвор на фосфатен буфер.

4. Анализи

Количеството на свързан белтък върху модифицираните ПАН мембрани се определя по метода на Lowry et al. [7].

Активността на свободната и имобилизирана АХЕ се определя по метода на Ellman [3].

5. Електрохимични измервания

Електрохимичните измервания се провеждат на апаратура Palm Sens (Холандия) с три-електродна система от сравнителен електрод – Ag/AgCl , насрещен електрод платинова жичка и работен електрод – ПАН Мб+ Au HCl/Pt електрод. Апаратурата е със софтуерна програма и компютър.

Електродите се потапят в 50 ml фосфатен буфер с pH 7,6. Изследват се цикличните волтаперометрични криви в отсъствие и в присъствие на $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (финална концентрация) АТХ като потенциалът се варира от 0 до 1 V . Когато се добави АТХ цикличната волтаперограма показва необратим пик на окисление на тиохолина, който се изявява при 800 mV и по този начин се определя потенциалът за провеждане на амперометричните измервания.

След това електродите се тестват за построяване на кривата: силата на тока – време, при работен потенциал 800 mV срещу Ag/AgCl електрод. Това се осъществява като след стабилизирането на електричния ток се добавя неколкостранно по $100 \mu\text{l}$ АТХ с концентрация 2 mM в електрохимичната клетка, съдържаща 50 ml фосфатен буфер с pH 7,6. На базата на кривата: силата на тока – време, се строи стандартна калибровачна права: сила на тока – концентрация на субстрата АТХ.

За определянето на концентрацията на пестициди, ензимната мембрана се потапя първо във фосфатен буфер съдържащ различни концентрации на параоксон за 15 минути и след това се прикрепя към платиновия електрод и се пренася в електрохимична клетка съдържаща фосфатен буфер с pH 7,6 и $100 \mu\text{l}$ АТХ с концентрация 2 mM , за да се определи отново амперометричния сигнал. Степента на инхибиране се определя по следната формула:

$$\text{Инхибиране (\%)} = \frac{(I_1 - I_2)}{I_1} \times 100,$$

където: I_1 – пиковия ток на ацетилтиохолина върху работния електрод;

I_2 – пиковия ток на ацетилтиохолина върху работния електрод, чийто мембрана е инхибирана с параоксон.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В настоящата работа е получена нова наноструктурирана матрица за имобилизация на ензима ацетилхолинестераза, чрез включване на златни частици с наноразмери към полиакрилонитрилна мембрана (ПАН 60 000).

Модифицираната Мб е получена чрез обработката на изходната ПАН мембрана с разтвор на NaOH, при която се въвеждат карбоксилни групи ($0,14 \text{ mEq. g}^{-1}$) на повърхността ѝ. След това през модифицираната Мб се пропускат златни НЧ чрез ултрафилтрация. На базата на предварителни експерименти е определено, че оптималната концентрация на Au наночастички е $5,74 \times 10^{12}$ бр. за 1 ml колоиден разтвор. Химичната модификация е съществена част от процедурата за приготвяне на матрицата за имобилизация на ензим, тъй като се осъществява по-хомогенно разпределение на златните НЧ. При изследване на водопроницаемостта на Мб е установено, че тя е малка ($0,35 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). Това е от съществено значение като се има в предвид предназначението на тази Мб за изготвяне на биосензори, при които не е необходима голяма водопроницаемост. Електросъпротивлението на Мб също е много малко ($10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$) и това убедително показва, че матрицата е много подходяща за изготвяне на амперометричен биосензор, тъй като ще гарантира засилване на електропреноса на електрони от ензимната матрица до трансдюзера.

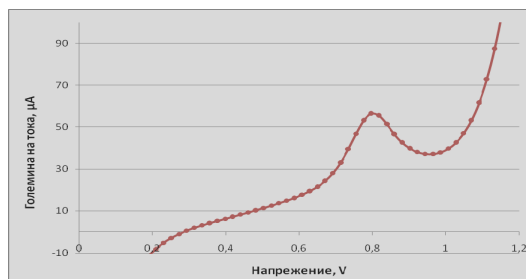
Получената химически модифицирана ПАН Мб с включени Au НЧ се обработва с алкохолен разтвор на меркаптопропионова киселина, с цел внасяне на допълнително количество карбоксилни групи на повърхността на НЧ.

Проведена е ковалентна имобилизация на ензима AXE върху наноструктурираната Мб с помощта на ЕДК. Ензимните молекули се свързват ковалентно към въведените COOH групи както на повърхността на модифицираната Мб така и към COOH групите по повърхността на златните частици.

Установено е, че AXE има максимална специфична активност при провеждане на имобилизационната процедура при температура 4°C , за време 15 часа и концентрация на ензимния разтвор 0,025%. При тези условия имобилизираната AXE върху наноструктурираната ПАН+НЧ мембрана има специфична активност - $308 \text{ U} \cdot \text{cm}^{-2}$, а количеството на свързания ензим е $30 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. Полученият биокатализатор е високоефективен – относителна активност 85% спрямо специфичната активност на свободния ензим.

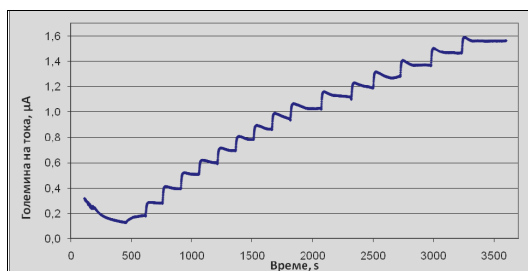
Свободната и имобилизираната AXE са силно чувствителни към действието на различни пестициди [1]. Последните подтискат ензимната активност. Те се извяват като необратими инхибитори на AXE и тя може да бъде използвана като аналитичен реагент за определяне на ниски концентрации на пестициди. В последните години интересът към имобилизираната AXE нараства, поради интензивното разработване на биосензори на тяхна основа [2,4,6]. Във връзка с това е изследвана възможността за приложение на получената наноструктурирана Мб с имобилизиран ензим за изготвяне на биосензор за определяне на ниски концентрации на пестицида параоксон. За целта последната се прикрепя към платинов електрод и той се включва в триелектродна амперометрична апаратура със специална софтуерна програма. Първо е изследвано електрохимичното поведение на системата ПАН Мб+НЧ+AXE/Pt електрод.

На фигура 1 е представен отрез от цикличната волтамперометрична крива на работния електрод – ПАН Мб+НЧ+AXE/Pt електрод. Вижда се, че когато се добави $100 \mu\text{L}$ 2 mM ATX към 50 mL 0,1M фосфатен буфер с $\text{pH} = 7,6$ на цикличната волтамперограма на този електрод се появява необратим окислителен пик при 800 mV. Появата на този пик се дължи на окислението на тиохolina, който е продукт от хидролизата на субстрата ATX, катализирана от имобилизираната AXE. Следователно за провеждане на амперометричното изследване е необходимо да се поддържа потенциал 800 mV.



Фигура 1. Отрез от циклична волтамперометрична крива на работен ПАН Мб+НЧ+АХЕ/Рt електрод при скорост на сканиране 50 mV.s^{-1}

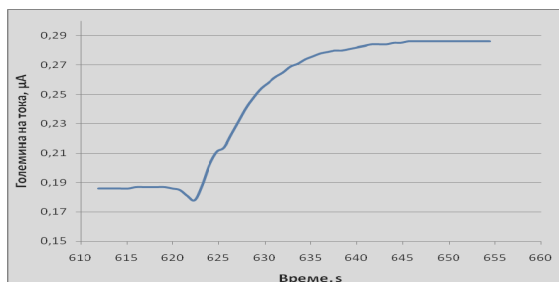
Изследвана е зависимостта между времето и силата на тока при поддържане на потенциал 800 mV и непрекъснатото добавяне на $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ АТХ (крайна концентрация) към фосфатен буфер с рН 7,6 - (фиг.2).



Фигура 2. Типична крива сила на тока - време на работен ПАН Мб+НЧ+АХЕ/Рt електрод при непрекъснатото добавяне на $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ АТХ (крайна концентрация) към фосфатен буфер с рН 7,6 при приложен потенциал 800 mV

При добавянето на определена доза АТХ към фосфатния буфер с рН 7,6 силата на тока се повишава вследствие на окислението на тиохалина и достига до определена стационарна стойност, след което се добавя нова порция субстрат.

Определен е амперометричния отговор на получения биосензор при еднократно добавяне на $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ АТХ (крайна концентрация) към фосфатен буфер с рН 7,6 при приложен потенциал 800 mV (фиг.3).

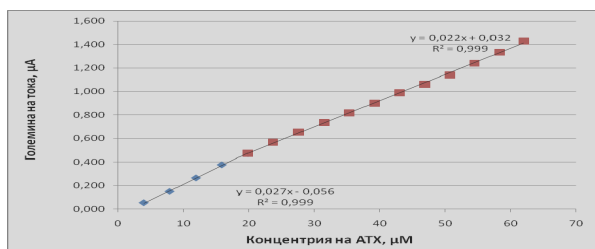


Фигура 3. Амперометричен отговор на ПАН Мб+НЧ+АХЕ/Рt електрод при еднократно добавяне на $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ АТХ (крайна концентрация) към фосфатен буфер с рН 7,6 при приложен потенциал 800 mV

Установено е, че ензимният електрод достига до 95% от стационарния ток за 25 секунди. Този бърз амперометричен отговор се дължи на металните НЧ, съдържащи

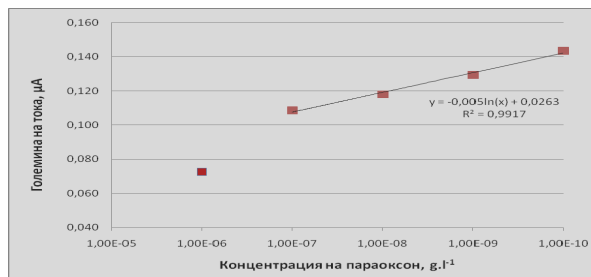
се в ензимната МБ, които ускоряват преноса на електрони от наноструктурираната МБ с имобилизиран ензим към Pt електрод.

Построена е калибровъчна графика по отношение на АТХ (фиг. 4). С повишаването на концентрацията на АТХ, амперометричният отговор расте линейно в две области. Първата е от 4 до 20 μmol , а втората от 20 до 64 μmol . Получен е висок корелационен коефициент и на двете линейни области, $R=0,999$ ($n=5$). Наклонът на линейната област определя селективността на биосензора, а тя е съответно при по-ниските концентрации на субстрата - $0,027 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, а при по-високата концентрации - $0,022 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.



Фигура 4. Калибровъчна графика на биосензора по отношение на АТХ

На фигура 5 е представена калибровъчната графика отразяваща зависимостта между концентрацията на инхибитора параоксон и амперометричният отговор на биосензора. Установен е линеен интервал при концентрации на параоксона от 1×10^{-10} до $1 \times 10^{-7} \text{ g.l}^{-1}$. И тук е получен висок корелационен коефициент $R=0,992$ ($n=5$). Получена е много добра чувствителност на този електрод по отношение на пестицида параоксон и ниска определяема лимитна концентрация на параоксона - $1 \times 10^{-10} \text{ g.l}^{-1}$.



Фигура 5. Калибровъчна графика на биосензора по отношение на пестицида параоксон

На таблица 1 е представена степента на инхибиране на АХЕ при съответните концентрации на параоксона, използвани при получаването на калибровъчната графика. Вижда се, че с увеличаване на концентрацията на параоксона се увеличава степента на инхибиране на ензима, както и амперометричният ток (фиг.5).

Таблица 1. Степен на инхибиране на имобилизирана АХЕ в присъствие на различни концентрации на параоксон

Концентрация на параоксон, g.l^{-1}	Степен на инхибиране, %
1×10^{-10}	0,9
1×10^{-9}	10,7
1×10^{-8}	18,5
1×10^{-7}	25,0
1×10^{-6}	49,8

От фигура 4 и 5 се вижда, че изготвения биосензор: ПАН М6+НЧ+АХЕ/Pt електрод притежава много добра чувствителност по отношение на ниски концентрации на АТХ и параоксон. Тази добра характеристика на биосензора се дължи на присъствие на златни наночастички в полимерната мембрана, съдържаща ензима ацетилхолинестераза. Следователно полученият биосензор има високи потенциални възможности за определяне на ниски концентрации на пестициди и гарантира осигуряването на добра чувствителност и бърз амперометричен сигнал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена е ковалентна имобилизация на ензима АХЕ върху ПАН мембрана, модифицирана с NaOH и в следствие включени в нея златни наночастички.

Конструиран е биосензор – ПАН + НЧ + АХЕ/Pt електрод, който притежава много добра чувствителност по отношение на ниски концентрации на ацетилтиохолин и пестицида параоксон.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Borte F., G. Lorenti, F. Mazzei, G. Simonetti, F. Porcelli, C. Borte, G. Scibona - Cholinesterase based bioreactor for determination of pesticides, *Sensors and Actuators B*, 18-19, 1994, 689-693.
- [2] Chio J., J. K. Kim, I. H. Lee, J. Min, W. H. Lee, *Biosensors & Bioelectronics*, 2001.
- [3]. Ellman G.L., K.D Courtney, Jr.V Andres, B.C. Featherstone, *Biochem. Pharmacol*, 7, 1961, 88.
- [4] Fennouh S., V. Casimiri, C. Burstein - Increased paraoxon detection with solvents using acetylcholinesterase inactivation measured with a choline oxidase biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 12, 2,1997, 97-104.
- [5] Gunther A., U. Bilitewski - Characterization of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system, *Analytica Chimica Acta*, 300, 1-3,1995, 117-125.
- [6] Kok F. N., v. Hasirci - Determination of binary pesticide mixtures by an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 19, 7,2004, 661-665.
- [7]. Lowry H., N. Rosenbough, H. Farr, *J. Chem.*, 193, 1951, 265.
- [8] Shi R., K. Stein - Flow injection analysis of paraoxon with the use of an immobilized acetylcholinesterase reactor, *Analytica Chimica Acta*, 324, 1, 1996, 21-27.

За контакти:

1. гл.ас. д-р Катя Габровска, Бургаски университет "проф. д-р Асен Златаров", тел. 056/858353, e-mail gabrovska@mail.bg
2. доц. д-р инж. Настя Василева, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев“, тел. 084/611012, e-mail: nastia2001@yahoo.com
3. Ивайло Маринов - докторант, Бургаски университет "проф. д-р Асен Златаров", тел. 056/858353, e-mail ivaylo.marinov@gmail.com
4. Явор Иванов – специалист, Бургаски университет "проф. д-р Асен Златаров", тел. 056/858353, e-mail qvor_bourgas@abv.bg
5. проф. д-р инж. Цонка Годжеваргова, Бургаски университет "проф. д-р Асен Златаров", тел. 056/858353, e-mail godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран.